

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Etude des effets de l'invalidation du gène CLN2 codant pour la TriPeptidyl Peptidase 1 (TPP-1) sur la population mitochondriale

TIHON, Eliane

Award date:
2012

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR

Faculté des Sciences

**Etude des effets de l'invalidation du gène *CLN2* codant pour la tripeptidyl
peptidase 1 (TPP-1) sur la population mitochondriale**

**Mémoire présenté pour l'obtention
du grade académique de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire**

Eliane TIHON

Janvier 2012

Etude des effets de l'invalidation du gène *CLN2* codant pour la tripeptidyl peptidase 1 (TPP-1) sur la population mitochondriale

TIHON Eliane

Résumé

Le déficit d'une activité enzymatique lysosomale peut mener à l'apparition d'une maladie de surcharge lysosomale (LSD) caractérisée par l'accumulation intra-lysosomale de matériel non dégradé. A l'heure actuelle, plus de 50 LSDs ont été décrites et ces pathologies sont généralement associées à des symptômes neuro-dégénératifs. Les Lipofuscinoses Céroïdes Neuronales (NCLs) forment un groupe de LSDs caractérisées par l'accumulation lysosomale de céroïdes, un pigment auto-fluorescent. Parmi toutes les classes de NCLs, la Lipofuscinose Céroïde Neuronale Infantile Tardive (LINCL) est une maladie neuro-dégénérative causée par la déficience de l'enzyme TriPeptidyl Peptidase-1 (TPP-1) codée par le gène *cln2*. Tandis que l'origine de la pathologie est bien définie, il reste encore beaucoup d'inconnues concernant l'impact de la déficience en TPP-1 sur la biologie de la cellule. Néanmoins, il semblerait que l'accumulation de matériel non-dégradé au sein des lysosomes mène à l'activation de voies de signalisation susceptibles de modifier la fonction d'autres organites.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés aux mitochondries et plus particulièrement aux effets potentiels d'une déficience en TPP-1 sur la morphologie et certaines fonctions mitochondriales dans des fibroblastes LINCL. Nous avons également étudié les effets éventuels d'une déficience en TPP-1 sur l'expression de gènes nucléaires codant pour des protéines mitochondriales.

Nous montrons que l'abondance mitochondriale ne semble pas affectée par la déficience enzymatique dans les cellules LINCL. Par contre, nos résultats suggèrent que la morphologie des mitochondries est perturbée par la déficience en TPP-1 puisque le réseau mitochondrial de fibroblastes LINCL est plus fragmenté que dans des fibroblastes contrôles. De plus, alors que la déficience enzymatique ne semble pas affecter l'abondance des ROS mitochondriaux, les cellules LINCL présenteraient une concentration en calcium mitochondrial matriciel et un potentiel de membrane mitochondriale plus élevés, et un contenu en ATP plus important. Nos résultats indiquent également que le gène codant la protéine pro-apoptotique Bnip3 semble surexprimé dans les fibroblastes LINCL, une protéine dont nous devons déterminer la fonction dans les cellules déficientes en TPP-1.

Mémoire de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2012

Promoteur: T. Arnould

Remerciements

Le mémoire touchant à sa fin, il est temps pour moi de remercier toutes les personnes ayant contribué de près ou de loin à la réussite de celui-ci.

Dans un premier temps, je voudrais remercier mon promoteur, Thierry Arnould, pour les nombreux conseils reçus au cours de ces dix mois, pour sa disponibilité et pour ses nombreuses corrections. Un tout grand merci d'avoir cru en mon travail et de m'avoir toujours poussée vers l'avant.

Je voudrais également remercier tous les seniors du labo de m'avoir accueillie au sein de l'URBC et d'avoir toujours été présents pour répondre à mes questions. Un grand merci également aux membres de l'équipe DYSO, et aux autres équipes en général, pour leurs bons conseils et leur sympathie au quotidien.

Merci aux techniciens pour leur disponibilité au sein du labo, et particulièrement à Edouard pour ses conseils si précieux, et à Noëlle et Catherine pour les nombreuses heures passées au confocal à analyser mes lames.

Je remercie également les autres mémorants et tout particulièrement Valérie, Elodie, J-M et Emilie pour les bons moments passés ensemble et leur soutien dans les moments plus difficiles.

Finalement, un tout grand merci à mon tuteur, Guillaume Van Beersel, qui aura sans aucun doute été la personne la plus importante pour moi au cours de ce mémoire ! Merci pour les techniques que tu m'as apprises, mais surtout pour ton soutien, ta disponibilité, tes bons conseils, ta gentillesse, et ton humour sans faille. C'est entre autre grâce à toi que, même si c'était dur, j'ai toujours continué à y croire.

Bien que ça n'ai pas été toujours facile de m'encadrer et de corriger mes erreurs (d'ailleurs, j'espère ne pas avoir contribué (de trop) à l'apparition de tes cheveux blancs...) tu as su garder ton calme (presque ☺) et me pousser vers l'avant.

Merci pour tout ce que tu as fait !

Je terminerai en remerciant mes proches et ma famille qui m'ont soutenue tout au long de ce parcours.

Liste des abréviations

A β	Peptide β -amyloïde
ADNmt	ADN mitochondrial
AIF	Apoptosis Inducing Factor
Akt	serine/threonine Protein Kinase
AMPK	AMP-activated protein kinase
ANT	Adenine Nucleotide Translocator
AP-1	Adaptator Protein 1
AP-2	Adaptator Protein 2
APE1/Ref-1	Apurinic/apyrimidinic endonuclease 1/redox effector factor
APAF1	Apoptotic Protease Activating Factor 1
APS	Persulfate d'ammonium
AR	Aspect Ratio
ASB	Albumine de sérum bovin
Atg	AuTophagy-related
ATP	Adénosine TriPhosphate
BAD	Bcl-xL/Bcl-2 associated death promoter
Bak	Bcl-2 homologous antagonist/killer
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	B cell lymphoma 2
Bcl-XL	B cell lymphoma extra large
bFGF	Basic fibroblasts growth factor
Bid	BH3-interacting domain death agonist
BiP	Binding immunoglobulin protein
Bnip1	Bcl-2/adenovirus E1B 19-kDa interacting protein 1
Bnip3	Bcl-2/adenovirus E1B 19-kDa interacting protein 3
CAD	Caspase-activated Dnase
CaMKI α	calcium calmodulin-dependent protein kinase I α
CBD	Coenzyme-binding domain
CCCP	Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone
CHO	Chinese Hamster Ovary Cell
Cox6C	Cytochrome C oxidase subunit VIc
CREB	cAMP Response Element Binding protein
CTL	Contrôle
DFF40	DNA fragmentation factor-40
DMS	Déficit Multiple en Sulfatase
DP	Dimerization Partner
DRP1	Dynamin-Related Protein 1
EDTA	Ethylen Diamine Tetra-acetic Acid
ERR α	Estrogen-Related Receptor α
Erv1	Essential for respiration and viability 1
ETC	Electron Transport Chain
FAN	Factor-associated with neutral sphingomyélinase activation
FasL	Fas Ligand

FIP200	Focal adhesion kinase (FAK) family Interacting Protein of 200 kDa
FIS1	Fission 1
FoxO3	Forkhead box O member 3
GABP	GA Binding Protein
GAPDH	Glyc��raldehyde 3-phosphate déshydrogénase
GED	GTPase Effector Domain
Grp75	Protéine régulatrice du glucose 75
HIF-1	Hypoxia Inducible Factor-1
HR	Coiled-coil domain
HRE	Hypoxia Responsible Element
HRP	Horse Radish Peroxidase
Hsc70	Heat shock cognate protein of 70 Kda
Hsp40	Heat shock protein of 40 kDa
HSP	Heavy Strand Promotor
Htr-2/Omi	High temperature requirement protein 2
JAK	Janus Kinase
LAMPs	Lysosomal-Associated Membrane Proteins
LAPF	Lysosome-Associated Protein containing PH and FYVE domain
LC3-I	Microtubule-associated protein 1 light chain 3
LC3-II	Microtubule-associated protein 2 light chain 3
Letm1	Leucine-zipper EF-hand containing transmembrane protein 1
LDH	Lactate D��shydrog��nase
LDL	Low Density lipoprotein
LIMPs	Lysosomal Integral Proteins
LINCL	Late Infantile Neuronal Ceroid Lipofuscinosis
LSD	Lysosomal Storage Disorder
LSP	Light Strand Promoter
M6P	Mannose-6-Phosphate
m-AAA	m, matrix of mitochondria oriented, homo- or heteromeric complexes containing paraplegin and/or Afg3L1 and Afg3L2 subunits
MAMs	Mitochondria-Associated Membranes
MAP	Mitogen Activated Protein
MARCH-V	Mitochondrial ubiquitin ligase membrane associated ring V
Mcl-1	Myeloid cell leukemia sequence 1
MCU	Mitochondrial Calcium Uniporter
MEF-2	Myocytes Enhancer Factor 2
MEFs	Mouse Embryonic Fibroblasts
MEM	Medium Essential Medium
MFN	Mitufusine
Mge1	Mitochondrial GrpE 1
MHC-II	Complexe d'histocompatibilité de classe II
Mia40	Mitochondrial intermembrane space assembly 40
MiB	Mitofusin Binding Protein
MICU1	Mitochondrial Ca ⁺⁺ Uptake 1
MLII	Mucopolidose de type II
MLIV	Mucopolidose de type IV

MLN64	StAR-related lipid transfer protein 3
MME	Membrane Mitochondriale Externe
MMI	Membrane Mitochondriale Interne
MPS II	Mucopolysaccharidose de type II
MPSIIIA	Mucopolysaccharidose de type III A
mPTP	Mitochondrial permeability transition pore
mTORC1	Mammalian target of rapamycin complex 1
mtTFB	Mitochondrial transcription factor B
MTT	Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-yl)-2,5diphényltriaziolum
MTS	Mitochondrial Targeting Sequence
NCLs	Neuronal Ceroid Lipofuscinosis
NCLX	Na ⁺ /Ca ²⁺ exchanger
NO	Oxyde nitrique
NPC	Niemann Pick de type C
NRF-1, 2	Nuclear Respiratory Factor-1, 2
OPA1	Optic Atrophy Factor 1
ORP1	Oxygen Regulated Protein 1
Oxa1	Cytochrome Oxydase Assembly 1
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDI	Protein disulfide isomerase
PDT	Photodynamic therapy
PFA	Paraformaldéhyde
PGC-1 α , β	Peroxisome-proliferator-activated-receptor γ Coactivator-1 α , β
PIB	Phosphatases Inhibitor Cocktail
PIC	Proteases Inhibitor Cocktail
PI3K	Phosphatidylinositol 3 kinase
PI3P	Phosphatidylinositol 3-phosphate
PINK1	PTEN-induced putative kinase 1
PKA	cyclic AMP-dependent protein kinase
PLAGL2	Pleomorphic Adenomas Gene-Like 2
POL γ	Polymérase γ
PPARs	Peroxisome Proliferator Activated Receptors
PPT1	Palmitoyl Protein Thioesterase-1
pRB	Protéine du rétinoblastome
PRC	PGC-1 Related Coactivator
PUMA	p53 upregulated modulator of apoptosis
PVDF	PolyVinylidèneDiFluoride
RE	Réticulum endoplasmique
RER	Réticulum endoplasmique rugueux
RIP140	Receptor Interacting Protein 140
ROS	Reactive Oxygen Species/Espèces radicalaires
SDHC	Succinate dehydrogenase complex, subunit c
SenP5	Sentrin/SUMO-specific protease
SERCA	sarco/ER Ca ²⁺ ATPase
SLC25A2	Solute Carrier Family 25 Member 2
SLC25A13	Solute Carrier Family 25 Member 13
SLC25A15	Solute Carrier Family 25 Member 15

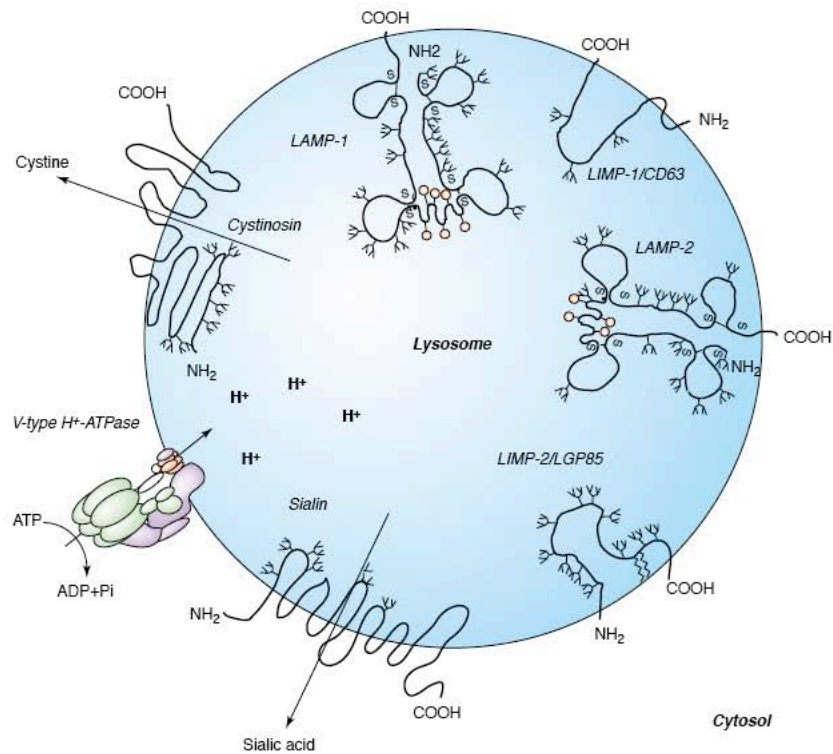
Smac/Diablo	Second mitochondria-derived activator of caspase
SNC	Système Nerveux Central
SOD1	Superoxide dismutase (Cu-Zn) 1
STATs	Signal Transducers and Activators Transcription
STOML2	Stomatin-like protein 2
SVF	Sérum de veau fœtal
TBF	Tris Buffered Saline
TEMED	Tétraméthyl éthylène diamine
Tfam	Mitochondrial Transcription Factor A
TFEB	Transcription Factor EB
TIM	Translocase of the Inner Membrane
TMRE	TetraMethylRhodamine Ethyl ester
TNF- α	Tumor Necrosis Factor- α
TNF-R	Tumor Necrosis Factor- Receptor
TOB	Translocase of Outer membrane β -barrel proteins
TOM	Translocase of the Outer Membrane
TPP-1	Tripeptidyl Peptidase 1
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TRP1, 2	Tetratrico-peptide repeat peptides 1, 2
UAF	Unités Arbitraires de Fluorescence
Ucps	Uncoupling proteins
ULK	Uncoordinated 51-Like Kinase
UPR	Unfolded protein response
URL	Unités Relatives de Luminescence
VDAC	Voltage-Dependent Anion Channel
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VHL	von Hippel-Lindau
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis proteins

Table des matières

TABLE DES MATIÈRES	1
1 INTRODUCTION.....	4
1.1 Les lysosomes.....	4
1.1.1 Généralités et structures	4
1.1.2 La biogenèse des lysosomes.....	4
1.1.3 Les fonctions des lysosomes	5
1.2 Les maladies de surcharges lysosomales.....	8
1.2.1 Généralités	8
1.2.2 Les lipofuscinoses cérébrales neuronales.....	9
1.2.3 Traitements	10
1.2.4 Les voies de signalisation et mécanismes moléculaires activés en réponse à une maladie de surcharge lysosomale	10
1.3 Les mitochondries :.....	12
1.3.1 Généralités	12
1.3.2 La biogenèse mitochondriale.....	13
1.3.3 Fonctions	14
1.3.4 Caractérisation de la protéine Bnip3	17
1.3.5 La morphologie mitochondriale	21
1.4 Contexte de la recherche et objectif du mémoire.....	25
2 MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	26
2.1 Culture cellulaire :	26
2.1.1 Lignées cellulaires utilisées	26
2.1.2 Culture cellulaire	26
2.2 Dosage protéique avec les réactifs de Pierce et Bradford :	26
2.2.1 Principe.....	26
2.2.2 Protocole.....	27
2.3 Restauration de l'activité enzymatique TPP-1 des fibroblastes LINCL :	27
2.3.1 Principe.....	27
2.3.2 Protocole.....	27
2.4 Dosage de l'activité enzymatique de la TPP-1 :	28
2.4.1 Principe.....	28
2.4.2 Protocole.....	28
2.5 Quantification de l'abondance du réseau mitochondrial (Mitotracker Green).....	28
2.6 Analyse de la morphologie du réseau mitochondrial :	29
2.7 Analyse de l'abondance protéique par Western Blot en fluorescence ou en chimioluminescence :.....	29
2.7.1 Préparation des échantillons	30
2.7.2 Préparation des gels.....	30
2.7.3 Préparation de la membrane et transfert des protéines	31
2.7.4 Incubation de la membrane avec les anticorps primaires et secondaires	31
2.7.5 Révélation et quantification.....	32

2.8	Immunofluorescence :	32
2.8.1	Principe	32
2.8.2	Protocole	32
2.9	Analyse d'expression de gènes : PCR en temps réel et PCR Array	33
2.9.1	Principe	33
2.9.2	Extraction de l'ARN et rétrotranscription:	33
2.9.3	PCR en temps réel	34
2.9.4	PCR Array	34
2.10	Dosage de l'ATP :	34
2.10.1	Principe	34
2.10.2	Protocole	35
2.11	Mesure du potentiel de membrane mitochondriale :	35
2.11.1	Principe	35
2.11.2	Protocole	35
2.12	Mesure de la concentration en calcium dans la matrice mitochondriale:	36
2.12.1	Principe	36
2.12.2	Protocole	36
2.13	Mesure de l'abondance mitochondriale en anions superoxydes :	36
2.13.1	Principe	36
2.13.2	Protocole	36
2.14	Test d'activité transactivatrice du facteur de transcription HIF-1:	37
2.14.1	Principe	37
2.14.2	Protocole	37
2.15	Méthode au MTT :	38
2.15.1	Principe	38
2.15.2	Protocole	38
2.16	Mesure du relargage de la LDH :	38
2.16.1	Principe	38
2.16.2	Protocole	39
2.17	Mesure de la fragmentation de l'ADN génomique :	39
2.17.1	Principe	39
2.17.2	Protocole	39
2.18	ARN interférence et transfection des cellules avec des siRNA :	39
3	RÉSULTATS	41
3.1	Vérification de la restauration de l'activité enzymatique de la TPP-1	41
3.2	Mesure de l'abondance de la population mitochondriale dans les cellules CTL, LINCL et LINCL + TPP-1	42
3.3	Etude des effets de la déficience en TPP-1 sur la morphologie mitochondriale	42
3.4	Effet d'une déficience en TPP-1 sur l'abondance de protéines impliquées dans la régulation des mécanismes de fusion/fission	44
3.5	Effet d'une déficience en TPP-1 sur le recrutement de la protéine DRP1 en membrane mitochondriale externe	45

3.6	Effet d'une déficience en TPP-1 sur le contenu intracellulaire en ATP	46
3.7	Effet d'une déficience en TPP-1 sur le potentiel de membrane mitochondriale.....	46
3.8	Effet de la déficience en TPP-1 sur la concentration en calcium matriciel mitochondriale en condition basale, et la capacité des mitochondries des cellules à tamponner une augmentation de la concentration calcique cytosolique	48
3.9	Effet de la déficience en TPP-1 sur la production de ROS mitochondriaux	49
3.10	Effet d'une déficience en TPP-1 sur l'expression de gènes nucléaires codant pour des protéines mitochondriales	50
3.11	La protéine Bnip3 est bien surexprimée dans les cellules LINCL	51
3.12	Effet d'une déficience en TPP-1 sur l'activité du facteur de transcription HIF-1	52
3.13	Effet d'une déficience en TPP-1 sur la sensibilité des cellules à l'induction de la mort cellulaire par apoptose :.....	53
4	DISCUSSION, PERSPECTIVES ET CONCLUSION.....	55
5	BIBLIOGRAPHIE	65



TRENDS in Cell Biology

Figure 1.1. Le lysosome: structure et protéines membranaires

Le lysosome est constitué d'une bicouche lipidique unique, enrichie en glycoprotéines LAMPs (Lysosomal-Associated Membrane Proteins) et LIMPs (Lysosomal Integral Proteins), et différents transporteurs dont la sialine et la cystinosine. On y retrouve également des H^+ -ATPases vacuolaires, qui sont impliquées dans l'acidification de la lumière lysosomale. Cette dernière est enrichie en hydrolases acides lysosomales qui participent à la dégradation de macromolécules. (D'après Eskelinen *et al.*, 2003)

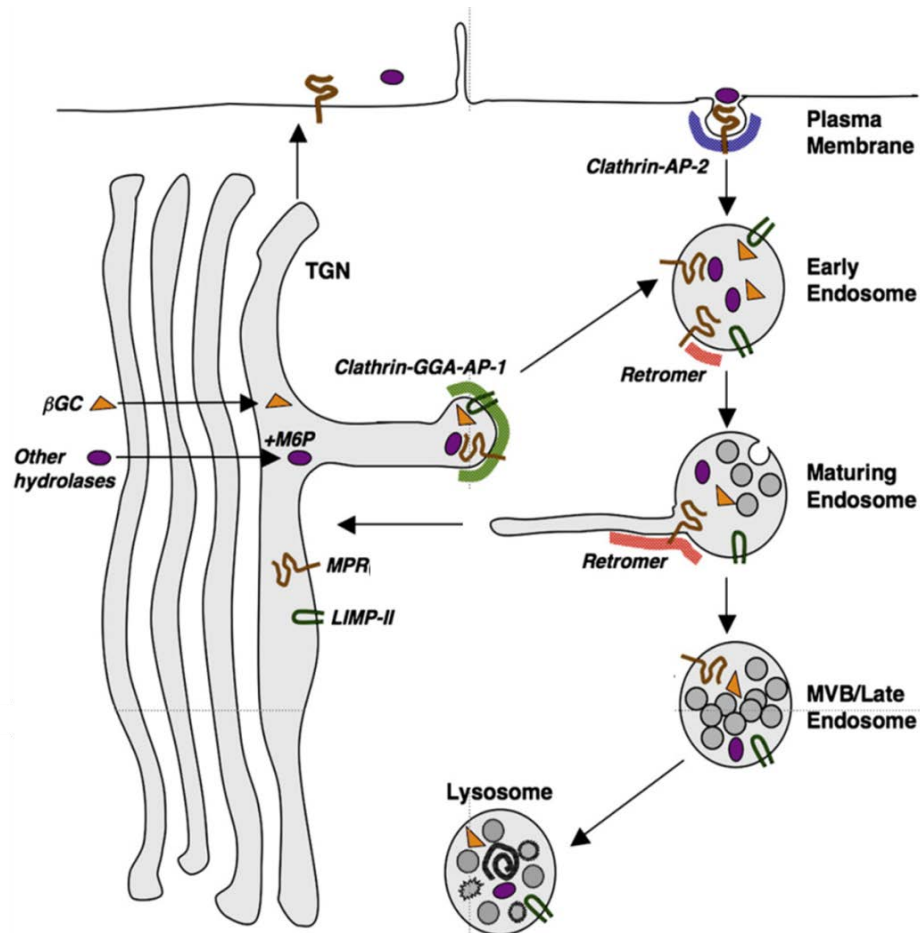


Figure 1.2. La biogenèse lysosomale

Après la traduction des ARNm codant pour les enzymes lysosomales au niveau du RER, les hydrolases acides lysosomales cheminent le long de l'appareil de Golgi, jusqu'à atteindre le réseau *trans*-Golgi. La plupart des hydrolases acides lysosomales reçoivent un signal M6P (Mannose-6-phosphate) qui sera reconnu par les récepteurs M6P présents dans le réseau *trans*-Golgi. Les complexes ligands-récepteurs ainsi formés se concentrent ensuite dans des vésicules recouvertes de clathrine grâce à la liaison des récepteurs aux protéines GGA (Golgi-localized γ -ear-containing Arf-binding-protein) et AP-1 (Adaptator Protein-1), afin d'assurer leur transport jusqu'aux endosomes. Pour ce faire, les récepteurs M6P possèdent un motif dileucine ou tyrosine dans leur domaine cytosolique C-terminal qui est nécessaire à la liaison du récepteur à GGA et AP-1. Une fois dans l'endosome, le pH acide induit la dissociation des enzymes et de leurs récepteurs. Ces derniers sont alors recyclés. Le transport de la β -glucocérébrosidase est, quant à lui, assuré par la liaison de l'enzyme à la protéine LIMP-2 (Lysosomal Integral Protein-2). Celle-ci possède également un motif dileucine ou tyrosine à son extrémité C-terminale, assurant sa liaison aux protéines GGA et AP-1.

Dans certains cas, les protéines lysosomales sont adressées à la membrane plasmique par la voie sécrétoire constitutive. Elles sont alors récupérées par des récepteurs M6P présents à la surface cellulaire et internalisées au sein d'une vésicule recouverte de clathrine suite à l'interaction entre le récepteur et la protéine AP-2. (D'après Braulke et Bonifacio, 2009)

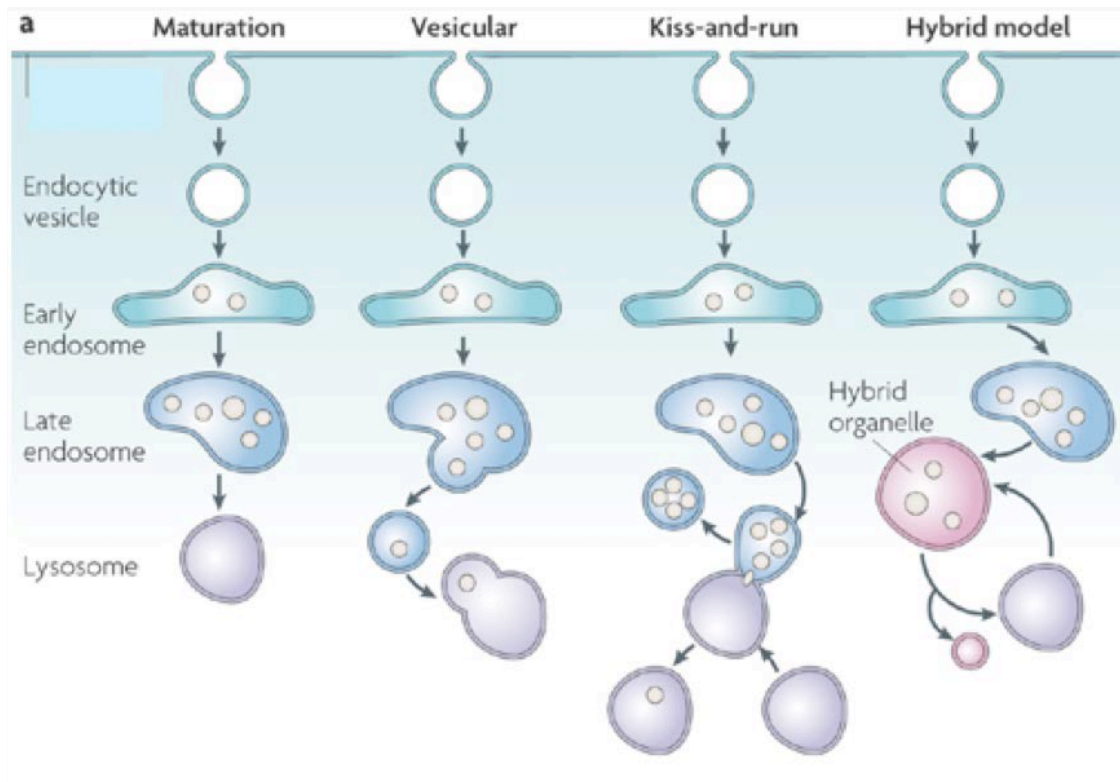


Figure 1.3. Les différentes hypothèses expliquant l'échange de contenu entre l'endosome et le lysosome.

Selon la première hypothèse (maturation), les endosomes tardifs mûrissent en lysosomes par addition graduelle de composants du lysosome et retrait des constituants de l'endosome tardif. La deuxième hypothèse (vesicular) suggère que des vésicules de transport assurent l'échange de matériel entre l'endosome et le lysosome. D'après le modèle « kiss and run », l'endosome et le lysosome fusionnent de manière transitoire afin d'assurer l'échange de matériel entre les deux compartiments. Finalement, le modèle hybride implique la formation d'un organite hybride à partir de la fusion complète de l'endosome et du lysosome. Les protéines endosomales sont ensuite recyclées par un transport vésiculaire, dans le but d'assurer la reformation du lysosome. (D'après Luzio *et al.*, 2007)

1 Introduction

1.1 Les lysosomes

1.1.1 Généralités et structures

Les lysosomes sont des organites cellulaires sphériques découverts par Christian de Duve en 1955 [1]. Ils ont un diamètre avoisinant généralement les 0,5 μm [2] et représentent entre 0,5 et 5 % du volume cellulaire. Ils sont particulièrement abondants près des centres organisateurs des microtubules [2,3]. Ces organites renferment un contenu hétérogène qui est délimité par une bicouche lipidique simple enrichie en glycoprotéines, telles que LAMP-1, LAMP-2 (Lysosomal-Associated Membrane Protein-1 and 2) et les LIMPs (Lysosomal Integral Membrane Proteins) [3]. Ces glycoprotéines sont, entre autres, impliquées dans la biogenèse du lysosome, dans l'homéostasie du cholestérol, et jouent un rôle dans l'autophagie et la fusion du lysosome à l'autophagosome [3,4,5,6]. Le lysosome renferme une cinquantaine d'enzymes hydrolytiques incluant notamment des phosphatases, des peptidases, des sulfatases, des protéases, des lipases, des glycosidases et des nucléases. Ces enzymes sont actives à un pH acide compris entre 4,5 et 5. De ce fait, des pompes appartenant à la famille des H^+ -ATPases vacuolaires sont essentielles à l'acidification de la lumière lysosomale (**figure 1.1**) [3,7,8].

1.1.2 La biogenèse des lysosomes

La biogenèse des lysosomes est complexe car elle fait intervenir et interagir les voies de biosynthèse et d'endocytose (**Figure 1.2**). Brièvement, après leur synthèse dans le réticulum endoplasmique rugueux (RER), les hydrolases acides subissent d'importantes modifications post-traductionnelles dans l'appareil de Golgi. Parmi celles-ci, notons l'addition d'un groupement mannose-6-phosphate (M6P) qui sera reconnu par les récepteurs M6P du réseau *trans*-Golgien. Ces récepteurs M6P possèdent un motif d'adressage lysosomal reconnu par les protéines AP-1 (Adaptator Protein 1) et/ou GGA (Golgi-localized γ -ear-containing Arf-binding-protein) qui vont recruter des protéines comme la clathrine afin d'assurer le transport vésiculaire des hydrolases acides [9]. Cette vésicule fusionnera préférentiellement avec un endosome précoce et y délivrera son contenu. L'environnement acide (+/- pH 6) de cette structure favorise la dissociation de l'enzyme et du récepteur M6P [3]. Ce dernier est alors recyclé vers le réseau *trans*-Golgien. *In fine*, les endosomes mûrent en lysosomes.

Bien que les mécanismes ne soient pas encore bien connus (ou acceptés unanimement), il existe plusieurs hypothèses concernant la maturation des lysosomes, et celles-ci sont brièvement schématisées à la **Figure 1.3**. Le mode de transport médié par des récepteurs M6P est le plus commun et est connu comme étant le mode de transport direct des hydrolases lysosomales [3,10]. Cependant, certaines enzymes suivent des modes de transports alternatifs et spécifiques. Par exemple, la β -glucocérébrosidase se lie à la glycoprotéine LIMP-2 au sein du RE afin pour assurer son adressage lysosomal. Une fois dans le lysosome, le pH acide permet la dissociation des deux protéines, LIMP-2 restant associée à la membrane [3]. Il existe également un mode de transport indirect par lequel les hydrolases lysosomales non marquées d'un signal M6P sont adressées à la membrane plasmique par une voie sécrétoire constitutive, au lieu d'être adressées au lysosome. Elles sont alors récupérées par des récepteurs M6P présents en surface cellulaire et internalisées au sein d'une vésicule recouverte de clathrines suite à l'interaction entre le récepteur et la protéine AP-2 (Adaptator Protein 2) [9]. La voie indirecte est notamment présente en conditions pathologiques, comme observé chez les patients atteints de la Mucopolidose de type II (MLII), maladie dans laquelle

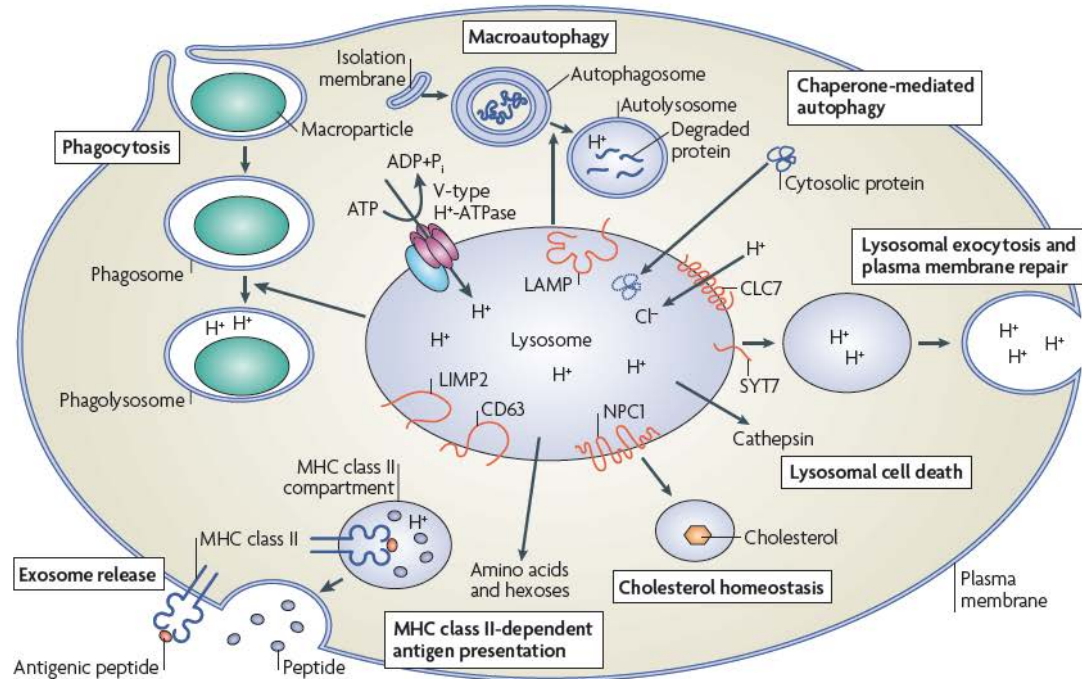


Figure 1.4. Composition et fonctions du lysosome

Le lysosome est un organelle essentiel à différents processus biologiques dont la dégradation de macromolécules par autophagie. Le terme autophagie désigne à la fois la macroautophagie, la microautophagie et l'autophagie médiée par les chaperonnes. Ces processus sont médiés par des mécanismes moléculaires très différents. Le lysosome joue également un rôle important dans la défense cellulaire en participant à la maturation du phagosome en phagolysosome lors de la phagocytose. De même, le lysosome est impliqué dans la présentation des antigènes associés au complexe majeur d'histocompatibilité de classe-II en membrane plasmique des cellules dendritiques. Cet organelle participe également à la réparation de la membrane plasmique, à l'homéostasie du cholestérol et, dans certaines conditions, au déclenchement de la mort cellulaire par apoptose et nécrose suite à la libération de cathepsines. (D'après Saftig et Klumperman, 2009)

la perte de l'activité N-acétylglucosamine phosphotransférase empêche les hydrolases lysosomales d'acquérir le signal M6P [3,11]. Les cellules des patients atteints de la MLII présentent donc un déficit en hydrolases acides lysosomales. Toutefois, un contenu normal en hydrolases acides est observé dans certains tissus comme le foie. Celles-ci sont en fait récupérées et adressées aux lysosomes par endocytose fluide chez les hépatocytes ; mais cette voie reste encore peu caractérisée [11].

Les protéines membranaires peuvent également être adressées au lysosome par voie de transport directe ou indirecte. De ce fait, la plupart des LAMPs et LIMPs seront associées à un motif d'adressage de type tyrosine ou di-leucine afin d'orienter leur sortie du réseau *trans*-Golgi [3]. Par exemple, les protéines LAMP-1 et LAMP-2 possèdent un domaine cytoplasmique C-terminal contenant une séquence de 10-20 acides aminés présentant un motif tyrosine de type YXX\$ qui interagira avec la protéine adaptatrice AP-2 (Y représente la tyrosine, X n'importe quel acide aminé, et \$ un acide aminé volumineux et hydrophobe). En fonction de l'acide aminé précédent cette séquence, le transport de la protéine sera direct (glycine) ou indirect (alanine) [12].

La biogenèse des lysosomes est également régulée au niveau transcriptionnel. En effet, il a récemment été montré que la plupart des gènes codant pour les protéines lysosomales (68 gènes sur les 96 connus), possèdent un motif GTCACGTGAC dans leur région promotrice [13]. Cette séquence consensus peut être retrouvée sous la forme d'une séquence unique ou en copies multiples, et est généralement positionnée 200 pb en amont du site d'initiation de la transcription. Cette séquence est reconnue par le facteur de transcription EB (TFEB), qui appartient à la famille des facteurs de transcription hélice-boucle-hélice. En réponse à une accumulation de macromolécules au sein des lysosomes, TFEB est transloqué au niveau du noyau pour augmenter la biogenèse lysosomale et tenter d'augmenter la dégradation de ces macromolécules [13]. Ainsi, il a été montré sur des cellules MEF (Murin Embryonic Fibroblast) cellules utilisées comme modèles pour différentes maladies de surcharge lysosomale dont la Mucopolysaccharidose de types II et IIIA, que le facteur de transcription TFEB est principalement retrouvé au niveau du noyau, comparé à des MEF de souris saines [13]. Par ailleurs, il semblerait que la translocation de TFEB du cytoplasme vers le noyau soit assurée par la régulation du degré de phosphorylation de TFEB [14]. Ainsi, la protéine serait phosphorylée sur une dizaine de résidus à l'état basal, et une diminution du niveau de phosphorylation de TFEB serait requise pour assurer son recrutement nucléaire. Il a récemment été montré que la phosphorylation de TFEB par mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1) au niveau du motif riche en résidus sérine présent dans la partie C-terminale du facteur de transcription induit sa translocation au niveau du noyau, tandis que le niveau global de phosphorylation de la protéine est diminué [14].

Une augmentation de la biogenèse lysosomale peut être observée lors d'une carence en nutriments [15]. Celle-ci est associée à l'induction de l'autophagie et a pour but de répondre aux demandes nutritionnelles et énergétiques des cellules (voir point 1.1.3). Une diminution de la biogenèse lysosomale a pour sa part été observée dans des hépatocytes murins déficients en LAMP-2, une mutation caractéristique de la maladie de Danon, une maladie de surcharge lysosomale caractérisée par une accumulation de glycogène dans les lysosomes [5,16] conduisant à une accumulation de vacuoles autophagiques et de macromolécules non-dégradées dans les cellules.

1.1.3 Les fonctions des lysosomes

Les lysosomes sont des organites complexes impliqués dans divers processus biologiques tels que la dégradation de macromolécules (intra et extracellulaires) et organites par l'action des hydrolases acides, la réparation de la membrane plasmique, ou encore l'homéostasie du cholestérol intracellulaire et les processus de mort cellulaire (**Figure 1.4**)[3].

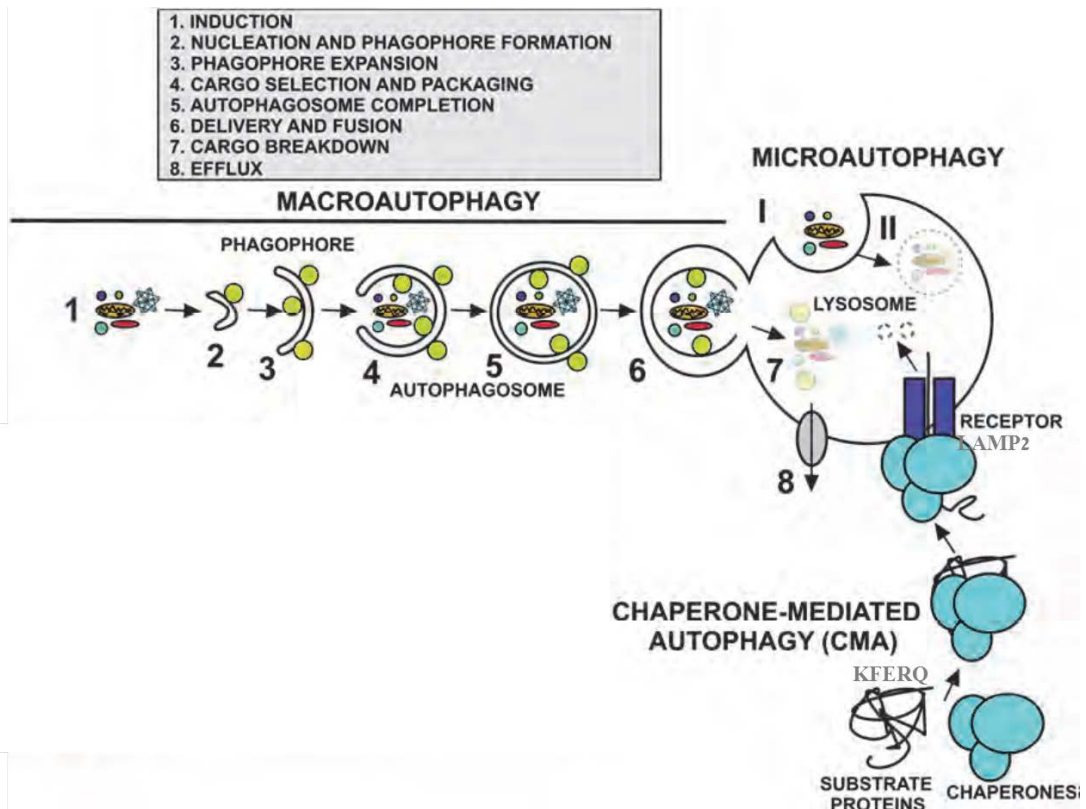


Figure 1.5. Schéma reprenant les différents types d'autophagie

L'autophagie est un processus biologique caractérisé par la macroautophagie, la microautophagie et de l'autophagie médiée par les chaperonnes. Elle est impliquée dans la dégradation de molécules intracellulaires dont certaines protéines non fonctionnelles.

La macroautophagie implique la formation d'un phagophore à partir d'une double membrane provenant du RE ou de la mitochondrie. Celle-ci mature ensuite en un autophagosome et fusionne avec le lysosome pour y délivrer son contenu.

La microautophagie est caractérisée par l'internalisation d'une petite portion du cytoplasme suite à l'invagination de la membrane du lysosome.

L'autophagie médiée par les chaperonnes assure la dégradation de protéines marquées par le signal KFERQ (lysine, phenylalanine, acide glutamique, arginine, glutamine). Ce motif est reconnu par un complexe de chaperonnes qui se lie ensuite à LAMP2 (Lysosomal-Associated Membrane Protein 2) localisée dans la membrane lysosomale. LAMP2 serait donc une molécule importante pour assurer l'internalisation des protéines à dégrader. (D'après Mijaljica *et al.*, 2011)

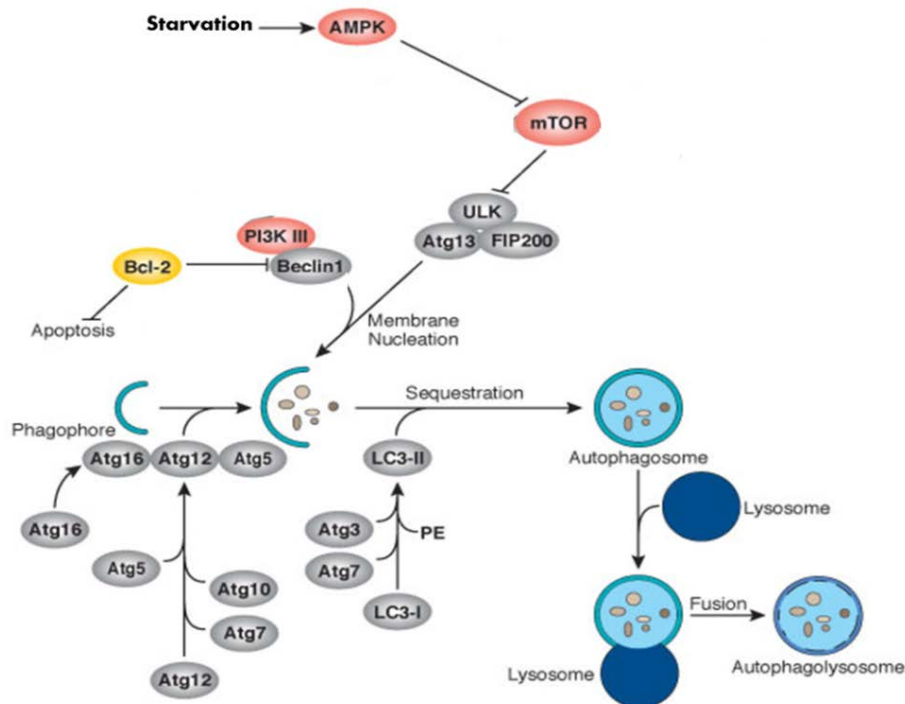


Figure 1.6. Les mécanismes moléculaires de l'autophagie

Les mécanismes moléculaires conduisant à la formation de l'autophagosome seront différents suivant l'état nutritionnel de la cellule. En absence de nutriments, la protéine mTOR (mamalian target of rapamycin), normalement impliquée dans la synthèse des protéines et l'inhibition de l'autophagie, est inactivée suite à la phosphorylation des sérines 722 et 792 par AMPK (AMP-activated protein kinase). L'inactivation de mTOR conduit à la déphosphorylation des protéines ULK1 (Uncoordinated 51-Like Kinase) et Atg13 (AuTophagy-related 13), qui s'associent alors à FIP200 (focal adhesion kinase (FAK) family Interacting Protein of 200 kDa) pour former le complexe ULK1-Atg13-FIP200. Ce dernier joue un rôle important dans les premières étapes de la formation de l'autophagosome. En effet, il a été montré que FIP200 et Atg13 assurent le recrutement et la stabilité de ULK1 au niveau du pré-autophagosome, et que ULK1 joue un rôle important dans l'induction de l'autophagie. Un deuxième complexe nécessaire à l'initiation de l'autophagie, et donc à la formation de l'autophagosome, associe la protéine Beclin à la phosphatidylinositol 3-kinase hVps34 de classe III. Pour ce faire, Beclin doit premièrement être dissociée de Bcl-xL (Basal cell lymphoma-extra large) ou Bcl2 (B-cell lymphoma 2) suite à la phosphorylation de Bcl-xL, ou à la libération de la protéine par la liaison de Bcl-2 avec une autre protéine possédant un domaine BH3, telle que BAD (Bcl-xL/Bcl-2 associated death promoter) et Bnip3 (Bcl-2/adenovirus E1B 19 KDa-interacting protein 3). Une fois formé, le complexe Beclin-hVps34 participe à l'initiation de l'autophagie en générant du PI3P (phosphatidylinositol 3-phosphate). L'élongation de l'autophagosome est ensuite assurée par le complexe Atg5-Atg12-Atg16 et LC3-I (microtubule-associated protein 1 light chain 3). Atg5-Atg12-Atg16, tout comme Atg3 et Atg7, participent à la liaison de la phosphatidyléthanolamine (PE) à LC3-I pour former LC3-II qui pourra s'insérer dans la membrane de l'autophagosome. L'autophagosome alors formé se déplace le long des microtubules jusqu'à fusionner avec un lysosome où son contenu sera dégradé. En présence de nutriments, l'autophagie est dite sélective et permet de dégrader des protéines ciblées et des organites endommagés ou non fonctionnels [1,2,3].

(D'après <http://www.cellsignal.com/reference/pathway/Autophagy.html>)

1.1.3.1 Dégradation de macromolécules et/ou organites par autophagie

1.1.3.1.1 L'autophagie

Tandis que la dégradation du matériel extracellulaire est principalement régulée par l'endocytose, la phagocytose et la pinocytose [17], les composants intracellulaires destinés à être dégradés au sein du lysosome peuvent y être délivrés par un processus catabolique appelé autophagie [17]. Ce processus est fortement régulé et implique un réarrangement dynamique des membranes afin d'enfermer le matériel à dégrader au sein de vésicules qui seront finalement adressées au lysosome.

L'autophagie joue un rôle important dans le maintien et la survie de la cellule et peut être répertoriée en 3 catégories, à savoir la microautophagie, la macroautophagie, et l'autophagie médiée par les chaperonnes (**Figure 1.5**) [18]. Dans la microautophagie, une petite portion du cytoplasme est internalisée dans le lysosome puis dégradée suite à l'invagination de la membrane lysosomale. La macroautophagie est caractérisée par la formation d'une vésicule membranaire, appelée autophagosome, à partir d'une double membrane originaire du RE ou de la mitochondrie [19] autour d'une portion cytoplasmique plus ou moins importante (pouvant contenir des organites entiers) [20]. La macroautophagie est notamment activée en réponse à une carence en nutriments. Elle est alors non-sélective et a pour but de générer de l'énergie et des unités constitutives nécessaires à la survie de la cellule [18]. Le processus de la macroautophagie est également impliqué dans la dégradation de protéines mal conformées, qui pourraient devenir toxiques pour la cellule si elles s'accumulaient. Enfin, la macroautophagie est un processus qui peut être très sélectif. On parlera alors de la mitophagie, c'est-à-dire de la dégradation spécifique des mitochondries non fonctionnelles [21], de la réticulophagie [22], de la ribophagie [23] ou encore de la pexophagie [20] pour, respectivement, la dégradation du RE, des ribosomes et des peroxysomes.

L'autophagie médiée par les chaperonnes implique la reconnaissance du pentapeptide KFERQ (lysine, phenylalanine, acide glutamique, arginine, glutamine) présent sur les protéines à dégrader, pour favoriser leur élimination sélective. Cette voie est activée en réponse à un stress cellulaire, tel qu'une carence en nutriments prolongée, et ne nécessite pas de transport vésiculaire [24]. Le motif KFERQ est alors reconnu par la chaperonne cytosolique Hsc70 (Heat shock cognate protein of 70 kDa) (active une fois liée à l'ADP) qui, associée à ses co-chaperonnes Bag1 (BCL2-associated athanogene), Hip (Hsc70 Interacting Protein), Hop (Hsp70-Hsp90 Organizing Protein) et Hsp40 (Heat shock protein of 40 kDa), délivre les protéines possédant ce pentapeptide au lysosome pour conduire à leur dégradation [24]. La protéine LAMP2 agirait comme un récepteur dans la membrane lysosomale, et favoriserait l'internalisation des protéines à dégrader [24]. Les mécanismes moléculaires complexes menant à l'initiation de l'autophagie sont schématisés à la **Figure 1.6** et revus par Ganley *et al.* (2009), Meijer et Codogno (2009) et Vergne *et al.* (2009)

Les produits de dégradation (ex : acides aminés, sucres, acides gras, cholestérol) sont finalement exportés dans le cytosol où ils seront réutilisés [25]. Cependant les lysosomes contenant du matériel ne pouvant pas être dégradé, ni éliminé par exocytose, restent dans le cytosol et forment les corps résiduels. Ces amas de matériels non dégradés forment la lipofuscine, un pigment autofluorescent composé de protéines, de lipides et de métaux qui s'accumule à l'intérieur des cellules au cours du vieillissement [26]. Bien que les mécanismes impliqués dans la formation de la lipofuscine soient encore peu caractérisés, il semblerait que les espèces radicalaires dérivées de l'oxygène (ROS : reactive oxygen species) produites par les mitochondries au cours du vieillissement favoriseraient l'oxydation et l'agrégation de protéines en lipofuscine [27]. L'accumulation de lipofuscine au sein des lysosomes peut mener à la sensibilisation de la membrane lysosomale suivie de la libération de lipofuscine

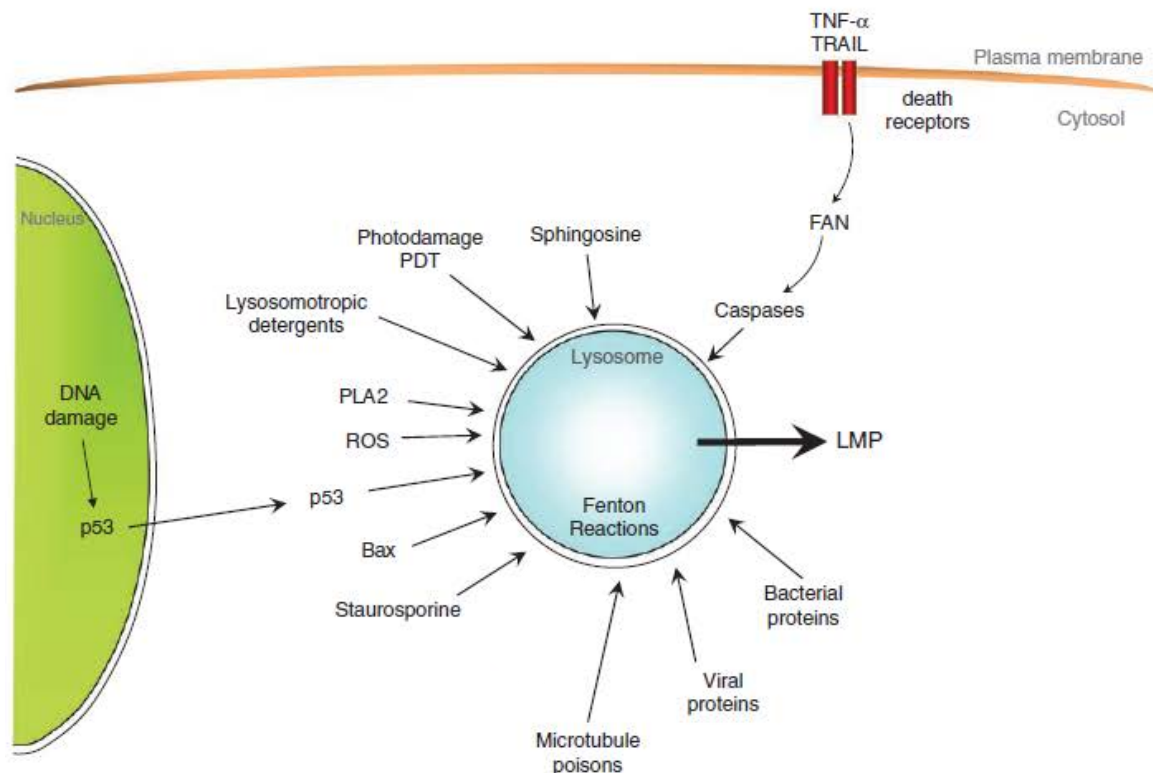


Figure 1.7. Différents mécanismes induisant la perméabilisation de la membrane lysosomale

Différents mécanismes participent à la perméabilisation de la membrane lysosomale. Par exemple, le peroxyde d'hydrogène (ROS), connu pour traverser librement la membrane lysosomale, va induire la perméabilisation de cette dernière en interagissant avec les ions ferreux présents au sein du lysosome. En effet, l'interaction entre le H_2O_2 et le fer catalyse la formation de radicaux hydroxyles, qui vont alors fragiliser la membrane lysosomale suite à la peroxydation lipidique dans les membranes. La sphingosine, s'intercalant dans les phospholipides, induit également la perméabilisation de la membrane lysosomale en agissant comme un détergent. En réponse au TNF- α , le niveau intracellulaire de sphingosine va augmenter, facilitant ainsi son insertion en membrane lysosomale. Différentes protéines pro-apoptotiques participent aussi à ce phénomène, dont Bax et p53. Par exemple, en réponse à une activation du récepteur de mort comme TRAIL, la voie des caspases sera activée et la caspase 8 induira l'activation et la translocation de Bax dans le lysosome, où elle va participer à la déstabilisation de l'organite. Pour sa part, p53 induit cet événement en réponse à un dommage de l'ADN. p53 est alors transporté au sein du lysosome au moyen de la protéine LAPF, une protéine adaptatrice participant à la perméabilisation de la membrane du lysosome et de la mitochondrie. La staurosporine, un inhibiteur de nombreuses Ser/Thr kinase, facilite la translocation de Bax en membrane lysosomale. L'activation de la phospholipase A_2 (PLA $_2$), l'ajout des produits toxiques agissant sur les microtubules, ainsi que certaines infections virales (herpes simplex virus) et bactériennes (*Mycobacterium tuberculosis*) facilitent également la perméabilisation de la membrane lysosomale. Différents mécanismes sont donc impliqués dans la perméabilisation de la membrane lysosomale.

FAN: Factor-associated with neutral sphingomyélinase activation, LMP: Lysosomal Membrane Permeabilization, PDT: Photodynamic therapy, TNF- α : Tumor Necrosis Factor- α , TRAIL: TNF-related apoptosis-inducing ligand, LAPF: Lysosome-Associated Protein containing PH (Pleckstrin Homology) and FYVE domain. (D'après Boya et Kroemer., 2008)

dans le cytosol qui n'est pas dégradée par le protéasome [28]. L'accumulation de la lipofuscine dans les cellules peut, entre autres, favoriser l'apparition de maladies neurodégénératives et cirrhoses nutritionnelles [29].

1.1.3.2 L'homéostasie du cholestérol intracellulaire

Les lysosomes jouent également un rôle dans le transport et l'homéostasie du cholestérol intracellulaire. Le cholestérol est transporté depuis le foie vers les différents organes sous la forme d'esters de cholestérol grâce aux LDLs (Low Density Lipoproteins). La liaison des LDLs à leurs récepteurs induit l'endocytose de ces derniers au sein des cellules cibles. L'hydrolyse des esters de cholestérol par la lipase acide lysosomale permet la libération du cholestérol et des acides gras vers différentes destinations telles que la membrane plasmique et le RE. Les protéines NPC1 (Niemann Pick C1), une glycoprotéine lysosomale, et NPC2 (Niemann Pick C2), une protéine soluble de la lumière lysosomale, sont nécessaires à la sortie du cholestérol libre depuis les lysosomes. En effet, le cholestérol non estérifié libéré se lie successivement aux protéines NPC2 et NPC1 qui assurent son transport hors du lysosome. Il reste cependant encore beaucoup d'incertitudes quant aux fonctions précises de ces protéines. Dans la maladie de Niemann Pick de type C, une pathologie induite par une mutation dans les gènes *npc1* ou *2*, le cholestérol s'accumule dans les lysosomes au lieu d'être libéré et transporté aux différentes structures subcellulaires. Cette pathologie touche en moyenne 1 personne sur 120 000 et le problème d'accumulation de cholestérol non estérifié conduit à une hépatosplénomégalie et une atteinte neurologique progressive [30,31].

1.1.3.3 Implication des lysosomes dans les processus de mort cellulaire

Outre son implication dans la dégradation de macromolécules et dans l'homéostasie du cholestérol, le lysosome joue également un rôle dans le déclenchement de la mort cellulaire par apoptose ou nécrose. En réponse à différents stimuli tels que l'activation de récepteurs de mort comme les récepteurs de la superfamille au TNF (TNF-R), l'activation du facteur de transcription p53 ou encore l'apparition d'un stress oxydatif, la membrane lysosomale peut voir sa perméabilité modifiée. Différents modes d'induction de cette perméabilisation sont repris à la **Figure 1.7**. Suite à ce changement de la perméabilité membranaire, on peut assister, dans certaines conditions, à la libération (sélective) d'enzymes protéolytiques (principalement les cathepsines B, D et L) dans le cytosol [32,33]. Ces enzymes sont stables à pH neutre pendant approximativement 1 heure et, bien que probablement moins actives, pourraient participer au déclenchement de la mort cellulaire par apoptose en clivant différentes protéines intracellulaires comme les procaspases-1,-3,-7 et -11 et la protéine pro-apoptotique Bid (BH3 interacting-domain death agonist), et en dégradant la protéine anti-apoptotique Bcl-2, ou encore en déstabilisant la membrane mitochondriale et facilitant ainsi la libération du cytochrome c (voir point 1.3.3.4) [32,33,34].

Les mécanismes assurant la perméabilisation de la membrane lysosomale sont peu connus. Un premier modèle portant sur l'induction de l'apoptose dans des cellules Jurkat après traitement au TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α), montre une accumulation de la sphingosine au sein du lysosome. Cette molécule agirait comme un « détergent » et permettrait de perméabiliser la membrane lysosomale pour favoriser la sortie sélective d'enzymes protéolytiques [35]. Une étude portant sur les stress oxydatifs indique que la génération de ROS peut induire une perméabilisation de la membrane lysosomale en activant la phospholipase A2 [36]. Cette dernière dégrade les phospholipides présents en membrane lysosomale et facilite ainsi la libération d'enzymes protéolytiques dans le cytosol [36]. De même, une étude portant sur le déclenchement de l'apoptose par le TNF- α dans des cellules MEF, montre que la caspase 9 induit la perméabilisation de la membrane lysosomale.

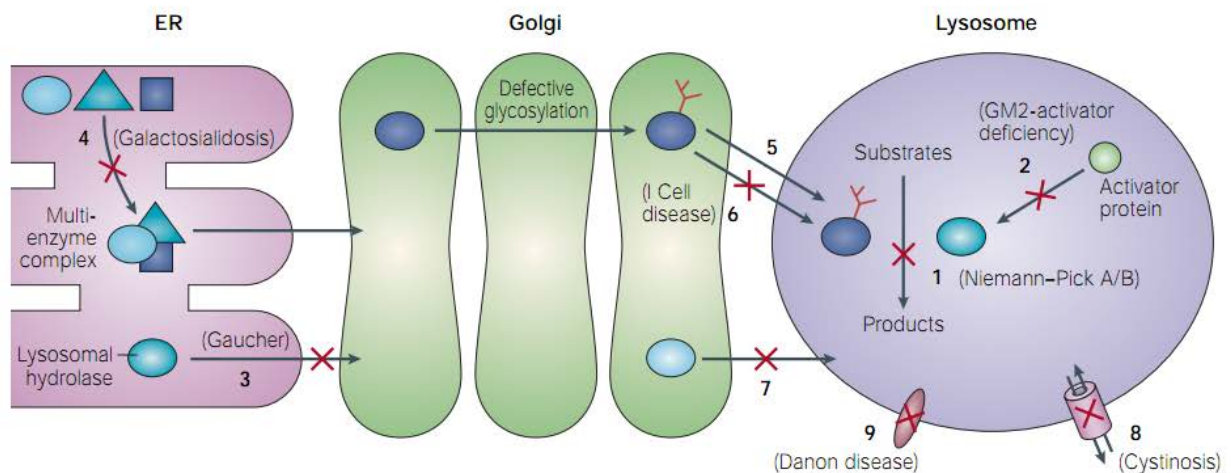


Figure 1.8. Types de mutations pouvant induire une maladie de surcharge lysosomale

La plupart des LSDs sont causées par la mutation d'un gène codant pour une hydrolase acide. Cette dernière est alors délivrée au lysosome sous une forme inactive (1). Ce phénomène est notamment observé dans les maladies de Niemann Pick de type A et B, caractérisées par une déficience en sphingomyélinase. La mutation peut également toucher un gène codant pour une protéine co-activatrice qui est essentielle à l'activité de l'hydrolase acide (2). En effet, dans la gangliosidose à GM2, c'est la mutation du gène codant pour la protéine activatrice GM2-Activator qui est à la base de la maladie. Les mutations peuvent également affecter une des étapes de maturation de la protéine (3) comme dans la maladie de Gaucher, ainsi que son transport hors du RE (4) comme dans la Galactosidose. Par ailleurs, un défaut de glycosylation de l'enzyme au niveau du Golgi, peut mener à une perte de son activité (5) situation retrouvée par exemple dans la Lipofuscinose Céroïde Neuronale Infantile Tardive, ou encore à une perte de son adressage lysosomal dû à une incapacité de liaison aux récepteurs M6P (Mannose-6-phosphate) (6). Par exemple, la MLII est causée par une mutation du gène codant pour la N-acétylglucosamine phosphotransférase, une enzyme qui est normalement impliquée dans l'acquisition du signal M6P des hydrolases acides au niveau du *cis*-Golgi. Ces enzymes sont alors adressées à la membrane plasmique par la voie sécrétoire constitutive au lieu d'être adressées au lysosome. La mutation d'un gène dont le produit est impliqué dans le transport des hydrolases acides hors de l'appareil de Golgi, de façon indépendante du M6P, pourrait également être à la base d'une LSD (7). Cependant, cela n'a pas encore été mis en évidence. Finalement, plusieurs LSDs sont causées par la mutation d'un gène codant pour une protéine de la membrane lysosomale. Ainsi, la cystinose est causée par la mutation de l'antiport H^+ /cystine (8), et la maladie de Danon par un déficit en LAMP-2 (9). (D'après Futerman et van Meer, 2004)

Disease	Defective protein	storage materials
<i>Mucopolysaccharidoses</i>		
MPS I	α -iduronase	Dermatan sulphate, heparan sulphate, GM2,GM3, SCMAS
MPS II	Iduronate-2-sulphatase	Dermatan sulphate, heparan sulphate, GM2,GM3, SCMAS
MPS IIIA	Sulphamidase	heparan sulphate, GM2,GM3, SCMAS, ubiquitin
MPS IIIB	N-acetyl- α -glucosamidase	heparan sulphate, GM2,GM3, SCMAS, unesterified cholesterol
MPS IIIC	Acetyl CoA α -N-acetyl-transferase	heparan sulphate, GM2,GM3, GD2
MPS IIID	N-Acetylglucosamine-6-sulphatase	heparan sulphate, GM2,GM3, GD2
MPS IVA	N-Acetylglucosamine-6-sulphate-sulphatase	Keratan sulphate, chondroitin-6-sulphate
MPS IVB	β -Galactosidase	Keratan sulphate, oligosaccharides
MPS VI	Arylsulphatase B	Dermatan sulphate,GM2,GM3, unesterified chol.
MPS VII	β -Glucuronidase	Heparan sulphate, dermatan sulphate, chondroitin-4 and 6-sulphahte, GM2, GM3, ubiquitin
Austin	Formylglycine generating enzyme	Heparan sulphate, dermatan sulphate, chondroitin-4 and 6-sulphahte, sulpholipids
<i>Sphingolipidoses</i>		
Fabry	α -Galactosidase A	Globotriasylceramide, galabiosylceramide, globotriaosylsphingosine, blood-group-B glycolipids
Faber lipogranulomatosis	Ceramidase	Ceramide
Gaucher	β -Glucosidase	Glucosylceramide, GM1, GM2, GM3, GD3, glucosylsphingosine
Krabbe	Galactocerebroside β -galactosidase	Galactosylceramide, psychosine lactosylceramide, globotriaosylceramide, globotetraosylceramide, fucosylneolactotetraosylceramide
Metachronic leukodystrophy	Arylsulphatase A	Sulphatide, 3-O-sulpholactosylceramide, lysosulphatide, seminolipid, gangliotetraosylceramide-bis-sulphate, GM2
Niemann-Pick A and B	Shingomyelinase	Sphingomyelin, cholesterol, bismonoacylglycerophosphate, GM2, GM3, glucosylceramide, lactosylceramide, globotriaosylceramide, globotetraosylceramide
GM1 gangliosidosis	β -Galactosidase	GM1, GA1, GM2, GM3, GD1Q, lyso-GM1, glycosylceramide, lactosylceramide, oligosaccharides, keratan sulphate
GM2 gangliosidosis (Tay-Sachs)	β -Hexosaminidase A	GM2, GD1qGalNAc, GA2, lyso-GM2
GM2 gangliosidosis (Sardhoff)	β -Hexosaminidase A and B	GM2, GD1aGAINac, globoside, oligosaccharides, lyso-GM2
<i>Oligosaccharidoses and glycoproteinoses</i>		
Aspartylglucosaminuria	Aspartylglucosaminidase	Aspartylglucosamine
Fucosidosis	α -Fucosidase	Fucose containing oligosaccharides and H-antigen-glycolipid
α -Mannosidosis	α -Mannosidase	Mannose-containing oligosaccharides, GM2, GM3
β -Mannosidosis	β -Mannosidase	Man(β 1-4)GlcNAc disaccharide
Sialidosis	Sialidase	Sialyloligosaccharides and sialylglycopeptides
Schindler disease	α -N-Acetulgalactosaminidase	Glycopeptides with N- or O-linked oligosaccharides, oligosaccharides
<i>Glycogenosis</i>		
Pompe disease	Glucosidase	Glycogen

Tableau 1.1. Classification des principales maladies de surcharge lysosomale en fonction du type de substrat accumulé au sein du lysosome (D'après Ballabio et Gieselmann, 2009)

Cependant, il n'est pas encore connu si la caspase 9 perméabilise la membrane lysosomale par interaction directe, ou via l'intermédiaire d'un substrat [37].

En conclusion, l'implication du lysosome dans l'activation de la voie apoptotique n'est pas encore bien caractérisée [34], ni communément admise. En effet, elle pourrait résulter d'un événement secondaire apparaissant au cours de la nécrose secondaire, comme démontré dans le cadre de l'apoptose induite par Fas dans les hépatocytes de rat, modèle dans lequel la fragilisation de la membrane lysosomale apparaît plus tardivement que les marqueurs de l'apoptose [33,38].

1.1.3.4 La réparation de la membrane plasmique

Finalement, il est intéressant de signaler que plusieurs données de la littérature démontrent que le lysosome participe à la réparation de la membrane plasmique. En effet, en réponse à une lésion de la membrane plasmique, par exemple induite lors d'un stress mécanique au niveau des cellules des tissus musculaires, on observe une augmentation de la concentration cytosolique en calcium libre $[Ca^{2+}]_c$ [39]. Cette dernière va réguler une forme d'exocytose dépendante du Ca^{2+} et favoriser le recrutement du lysosome au site de la lésion. Ce mécanisme requiert la participation de LAMP-1 et de la synaptotagmine VII, une protéine lysosomale ubiquiste, agissant comme un senseur calcique et possédant deux sites de liaisons au Ca^{2+} dans son domaine cytosolique. Les 15 isoformes de la famille des synaptotagmines sont impliquées dans des phénomènes d'exocytose qui dépendent du Ca^{2+} [39,40].

1.2 Les maladies de surcharges lysosomales

1.2.1 Généralités

Etant donné le rôle essentiel que joue le lysosome dans différents processus comme le contrôle de différentes voies de dégradation, l'homéostasie du cholestérol, ou encore la mort cellulaire, toute mutation d'un gène codant pour une hydrolase lysosomale, une protéine intégrale de la membrane, ou encore une protéine impliquée dans les étapes de maturations des hydrolases acides et des protéines membranaires, peut potentiellement induire/conduire à une maladie de surcharge lysosomale (LSD) (**Figure 1.8**).

Les LSDs sont des pathologies caractérisées par l'accumulation intra-lysosomale de macromolécules non dégradées qui surviennent, globalement, à une fréquence de 1/5000 naissances [41]. A l'heure actuelle, plus de 50 LSDs ont été découvertes et ont été classées en différents groupes en fonction de la nature de l'enzyme déficiente ou selon le type de matériel accumulé au sein du lysosome (**Tableau 1.1**). Par exemple, les Sphingolipidoses regroupent les différentes LSDs pour lesquelles les sphingolipides s'accumulent à l'intérieur du lysosome, tandis que les Lipofuscinoses sont caractérisées par l'accumulation de céroïdes, un pigment auto-fluorescent [42].

La plupart des LSDs sont associées à des manifestations cliniques affectant le système nerveux, comme cela est observé dans la Mucopolysaccharidose de type IV (MLIV) induite par un déficit du canal ionique mucopolysaccharidase 1 et caractérisée par une dégénération de la rétine, une nébulosité de la cornée, et un retard mental [43]. Cependant, certaines LSDs sont associées à des manifestations essentiellement périphériques. Par exemple, la maladie de Fabry, connue comme étant la deuxième LSDs la plus fréquente, est induite par une déficience en α -galactosidase A qui provoque une insuffisance rénale s'aggravant généralement en cardiomyopathie hypertrophique augmentant le risque de crise cardiaque [44].

La plupart de ces maladies sont des maladies autosomiques récessives. Toutefois, certaines d'entre elles sont liées de manière récessive ou dominante au chromosome X. Par exemple, la Mucopolysaccharidose de type II (MPS II), caractérisée par une déficience en Iduronate-2-Sulfatase et la maladie de Danon, induite par une mutation dans le gène codant

Age at disease onset	Gene symbol	Gene locus	Gene product
At / before birth			
Congenital NCL	<i>CLN10</i>	11p15	CtsD (lysosomal enzyme)
Infantile (or later)			
Infantile NCL	<i>CLN1</i>	1p32	PPT (lysosomal enzyme)
Late infantile (or later)			
"Classic" late infantile NCL	<i>CLN2</i>	11p15	TPP (lysosomal enzyme)
Finnish variant	<i>CLN5</i>	13q22	Lysosomal matrix protein
Indian-Iberic variant	<i>CLN6</i>	15q21-q23	Membrane protein
CLN7-associated Turkish variant	<i>CLN7</i>	4q28	Membrane protein
CLN8-associated Turkish variant	<i>CLN8</i>	8p23	Membrane protein
Juvenile			
"Classic" juvenile NCL	<i>CLN3</i>	16p12	Membrane protein
CLN9 Variante	<i>CLN9</i>	unknown	
Northern Epilepsy	<i>CLN8</i>	8q23	Membrane protein
Adult			
Adult autosomal recessive NCL	<i>CLN4</i>	unknown	
Adult autosomal dominant NCL		unknown	

Tableau 1.2. Classification des Lipofuscinoses Céroïdes Neuronales

D'après http://ncl-netz.de/en/physician_info.htm

	Lipofuscine	Céroïdes
Localisation	Lyosome	Lyosome
Propriétés spectrales		
Excitation	320-480	Maximum 360
Emission	460-630	Maximum 539
Composition		
Protéines	-Mélange hétérogène, β -amyloïde	-Sous-unité C de l'ATP synthase, saposines, β -amyloïde
Lipides	-Triglycérides, acides gras, cholestérol, dolichols, dolichols phosphorylés	-dolichols phosphorylés, phospholipides, lipides neutres
Carbohydrates	-Oligosaccharides liés aux dolichols	- Oligosaccharides liés aux dolichols
Métaux	-Fe, Cu, Al, Zn, Ca, Mn	-Fe majoritairement
Propriétés histochimiques		
Noir Soudan	Positive	Positive
PAS (Periodic Acid Schiff)	Positive	Positive
Concanavaline A	Positive	Positive
Agglutinine	Négative	Positive
Apparence ultrastructurale		
Granuleux	Positive	Positive
Curviligne	Négative	Positive
Profil d'empreintes digitales	Négative	Positive

Tableau 1.3. Comparaison des compositions de la lipofuscine et des céroïdes

(D'après Seehafer et Pearce, 2006)

pour la protéine membranaire LAMP-2, sont deux cas de LSDs liées au chromosome X [41,45]. Dans certains cas, la déficience enzymatique n'est pas viable, induisant une mort *in utero*, comme observé pour la lipofuscinose céréoïde neuronale congénitale induite par une déficience en cathepsine D [44].

Dans le cadre de ce mémoire, et dans le but d'étudier l'impact potentiel d'une surcharge lysosomale sur la population mitochondriale, c'est la pathologie appelée « Lipofuscinose Céroïde Neuronale Infantile Tardive (LINCL) » que nous allons plus particulièrement détailler dans les chapitres qui suivent.

1.2.2 Les lipofuscinoses céréoïdes neuronales

1.2.2.1 Lipofuscinoses et céréoïdes

Parmi toutes les LSDs, les Lipofuscinoses Céroïdes Neuronales (NCLs) forment un groupe important de maladies neurodégénératives induites par une mutation dans l'un des 10 gènes *cln* (*cln1-10*). Les fonctions des protéines encodées par les gènes *cln10* (Cathepsin D), *cln1* (Palmitoyl Protein Thioesterase-1 (PPT1)), *cln2* (Tripeptidyl Peptidase-1 (TPP-1)) et *cln3* (Palmitoyl Protein Delta-9 Desaturase) sont bien caractérisées. Toutefois, les protéines codées par les autres gènes de la famille *cln* restent peu connues (**Tableau 1.2**) [46,47]. Ces pathologies sont classées selon l'âge d'apparition des symptômes et on distingue donc des formes infantiles, juvéniles et adultes. Les NCLs affectent 1 naissance sur 12500 et sont toutes caractérisées par l'accumulation intra-lysosomale de céréoïdes, un lipopigment auto-fluorescent comparable à la lipofuscine (voir point 1.2.3.1.1) (**Tableau 1.3**). Les céréoïdes sont constitués de 60 % de protéines, 15 % de lipides et 20 % de glucides, et le métal prédominant retrouvé est le fer. Ils possèdent également des propriétés spectrales spécifiques (λ ex.: 360 nm ; λ ém.: 539 nm). Toutefois, la composition précise du matériel accumulé varie d'une pathologie à l'autre. Par exemple, dans les formes infantiles tardives et juvéniles des NCLs, la sous-unité c de la F₀/F₁ ATPsynthase mitochondriale représente jusqu'à 40 % du matériel accumulé au sein des cellules, tandis que la forme infantile de la maladie est plutôt caractérisée par une accumulation de Saposines A et D. Il a également été montré que le peptide amyloïde β (caractéristique de la maladie d'Alzheimer) s'accumule dans plusieurs NCLs [29].

Bien que l'accumulation de céréoïdes soit observée dans tous les tissus de l'organisme, les neurones et cellules gliales sont les principales cibles de cette accumulation et ce, en raison de leur faible/absence de renouvellement cellulaire [48]. Les personnes atteintes de NCLs souffrent généralement de problèmes visuels, d'un dysfonctionnement moteur et d'un retard mental souvent accompagné d'ataxie et de crises d'épilepsie [49]. Au cours de ce mémoire, nous nous sommes intéressés à la lipofuscinose céréoïde neuronale infantile tardive (LINCL)

1.2.2.2 La Lipofuscinose Céroïde Neuronale Infantile Tardive

La LINCL est causée par un déficit de la sérine-carboxy peptidase TriPeptidyl Peptidase-1 (TPP-1) [50]. Cette hydrolase lysosomale est codée par le gène *cln2*, qui est localisé sur le chromosome 11p15. Cette enzyme est synthétisée sous la forme d'une pro-enzyme de 66 kDa et possède une double activité : une forte activité exopeptidase et une faible activité endoprotéase nécessaire à la maturation de la pro-enzyme en enzyme active [46]. La glycosylation de 5 résidus particuliers est également requise à l'acquisition de la structure tertiaire de la protéine. Parmi ces modifications, on retrouve la N-glycosylation du résidu N286 (asparagine) qui est nécessaire à la maturation de la pro-enzyme en enzyme active [47,50]. La forme mature de la protéine possède un poids moléculaire de 46 kDa et prend part à la dégradation de la protéine pro-apoptotique Bid, de la sous-unité c de la F₀/F₁

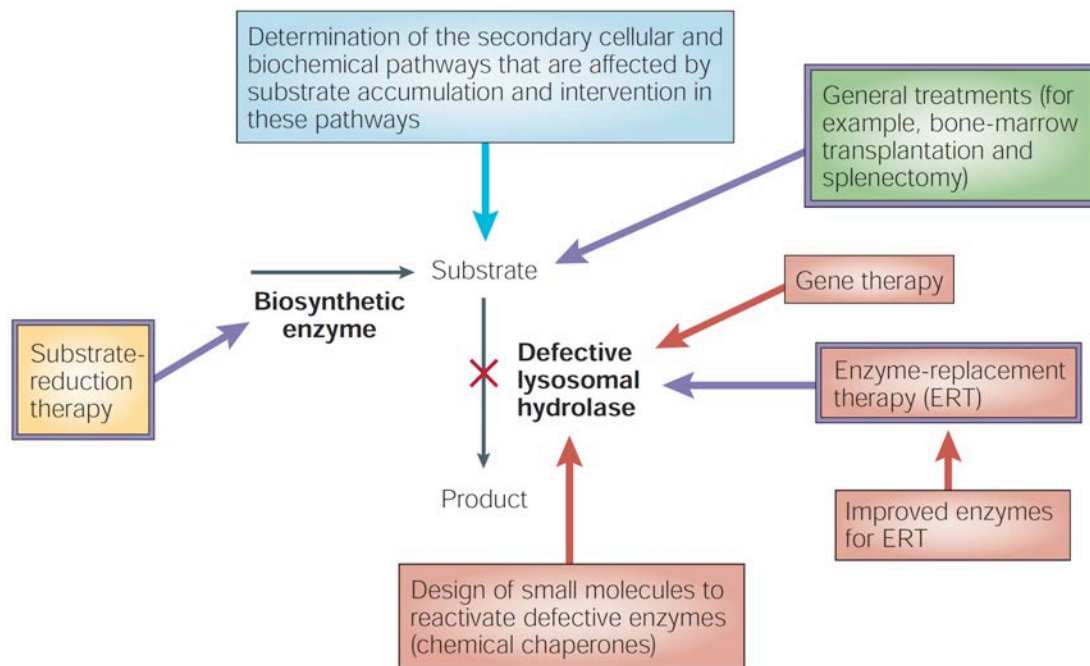


Figure 1.9. Différentes stratégies thérapeutiques pour traiter les LSDs

Les différentes options thérapeutiques actuellement disponibles pour traiter les LSDs sont encadrées en mauve, et sont classées en plusieurs catégories, suivant qu'elles ciblent directement l'enzyme déficiente (rouge), le substrat accumulé au cours de la pathologie (jaune), ou qu'elles interfèrent avec les symptômes comme dans le cas des traitements généraux (vert). Ainsi, dans le traitement dit par « enzyme de remplacement », l'enzyme déficiente est compensée par une enzyme recombinante, qui est administrée au patient. Une autre façon de restaurer l'expression de l'enzyme déficiente serait d'utiliser de petites molécules chimiques (des chaperonnes chimiques) capables de réactiver l'enzyme déficiente ou de recourir à la thérapie génique. Cependant, ces deux dernières options thérapeutiques ne sont pas encore disponibles. La thérapie dite de « réduction du substrat » est, quant à elle, utilisée afin de réduire la biosynthèse du substrat s'accumulant dans les cellules à cause de la maladie. Par exemple, la *N*-butyldéoxynojirimycine est utilisée pour bloquer la glycosylcéramide synthase, qui est la première enzyme impliquée dans la synthèse des glycolipides. Cet inhibiteur est utilisé pour traiter les patients atteints de la maladie de Gaucher, dans laquelle le déficit en glucocérébrosidase induit l'accumulation de glycolipides dans les cellules. Enfin, les traitements généraux, caractérisés par la transplantation de la moelle osseuse, ou d'un organe touché au cours de la maladie, sont également utilisés. Cependant, une meilleure compréhension des voies de signalisation et mécanismes moléculaires activés en réponse à une LSD, permettrait probablement d'améliorer les traitements disponibles, et d'en développer de nouveaux. (D'après Futerman et van Meer, 2004)

ATPsynthase et de différents neurotransmetteurs tels que la neuroméline B et la cholecystokinine qui sont impliquées dans la régulation de la satiété [46,47].

A l'heure actuelle, plus de 72 mutations ont été décrites comme pouvant causer l'apparition de la maladie [51]. Parmi celles-ci, les mutations « missenses » N286S (asparagine - sérine), I287N (isoleucine - asparagine), T353P (thréonine - proline) et Q422H (glutamine - histidine) affectent le repliement de la protéine qui est alors rapidement dégradée par la voie du protéasome [50].

Suite au dysfonctionnement de la TPP-1, les céroïdes s'accumulent dans tous les tissus de l'organisme et principalement au niveau du cerveau. Cette accumulation est suivie d'une dégénérescence du SNC (Système Nerveux Central), principalement au niveau du cervelet et de l'hypothalamus [52]. Les principaux symptômes de la maladie (crises d'épilepsie, dysfonctionnements moteurs, perte des fonctions cognitives et mentales) apparaissent dès la deuxième année de la vie de l'individu et s'aggravent jusqu'au développement d'une infirmité totale de celui-ci vers l'âge de 10 ans. Une mort précoce survient souvent avant l'âge de 14 ans [50,53].

1.2.3 Traitements

A l'heure actuelle, très peu de thérapies existent pour soigner les LSDs et ce, en raison du manque de connaissances concernant les mécanismes moléculaires précis de ces pathologies. Cependant, certaines options thérapeutiques sont déjà disponibles mais elles ne permettent pas la guérison définitive des LSDs (**Figure 1.9**) [42]. Par exemple, le traitement par « enzyme de remplacement », utilisant des enzymes humaines recombinantes comme option thérapeutique, est disponible depuis 1990 pour la maladie de Gaucher, une Sphingolipidose caractérisée par un déficit en glucocérébrosidase [54]. Dans ce type d'intervention, une enzyme comme la β -glucosidase recombinante expose des résidus mannoses qui seront reconnus par les récepteurs à mannoses présents en surface des macrophages afin d'assurer l'endocytose de l'enzyme et son adressage lysosomal. Toutefois, comme il s'avère parfois difficile d'assurer la stabilité de l'enzyme recombinante ainsi que son adressage aux cellules affectées par la pathologie, peu de thérapies de ce genre sont disponibles [42].

Une autre option thérapeutique fort étudiée depuis quelques années est la thérapie génique. Celle-ci consiste en l'introduction de matériel génétique au sein des cellules affectées par la mutation, dans le but de compléter le gène muté par une version fonctionnelle [42]. Concernant la LINCL, une étude a été réalisée portant sur l'administration d'un ADNc du gène *Cln2* humain au moyen d'un vecteur viral adéno-associé de sérotype 2 dans le SNC de 10 enfants affectés par la maladie [55]. Les effets de cette thérapie génique ont été étudiés au cours des 18 mois suivant l'opération, en comparaison avec des patients non traités. Bien que le traitement semble diminuer légèrement la progression de la maladie, différents effets secondaires sont apparus à cause du traitement comme des crises d'épilepsie aiguës. Cette première étude clinique est toutefois optimiste quant à l'apparition d'une thérapie génique efficace pour traiter la LINCL ou, du moins, améliorer les conditions de vie des patients [55].

1.2.4 Les voies de signalisation et mécanismes moléculaires activés en réponse à une maladie de surcharge lysosomale

Il a été démontré dans plusieurs études que l'accumulation de matériel non dégradé au sein du lysosome affecte des voies de signalisation secondaires et altère différents processus cellulaires menant, *in fine*, à la mort des cellules. Cependant, peu d'informations sont connues concernant l'identité de ces voies de signalisation et de leur mode de régulation [42].

Mentionnons simplement ici quelques exemples de voies de signalisation et mécanismes moléculaires activés en réponse aux LSDs.

1.2.4.1 L'altération de l'homéostasie intracellulaire du calcium

Le calcium cytosolique joue un rôle important dans la régulation de plusieurs réponses physiologiques telles que la prolifération cellulaire, l'expression de gènes, l'activation d'enzymes, ou encore la libération de neurotransmetteurs dans les neurones en réponse à l'activation de canaux voltage-dépendants [56,57]. De ce fait, une perturbation de l'homéostasie du calcium peut induire l'apparition de différents stress cellulaires, comme l'apparition de stress oxydatifs et la mort des cellules. Par exemple, dans la maladie de Niemann-Pick de type A, l'accumulation de sphingomyéline en réponse au déficit d'activité de la sphingomyélinase acide inhibe l'activité des pompes sarco/ER Ca^{2+} -ATPase (SERCA), qui sont normalement impliquées dans la réinternalisation du calcium cytosolique au sein du RE. Une concentration élevée en calcium est donc maintenue dans le cytosol, induisant *in fine* la mort cellulaire. Les personnes affectées par cette maladie rencontrent de fortes atteintes du SNC et meurent généralement avant l'âge de 2 ans [41,58].

1.2.4.2 Apparition et développement d'une inflammation chronique

Les LSDs affectant le SNC sont généralement caractérisées par l'apparition d'une inflammation chronique dont la sévérité est directement proportionnelle à la gravité des symptômes. Par exemple, dans les gangliosidoses à GM1 et GM2 caractérisées par l'accumulation de gangliosides (composants des membranes des cellules du SN) au niveau du cerveau, s'observe une accumulation de macrophages activés dans cet organe [59]. En fait, l'accumulation de lipides dans les cellules neurales favorise la libération de stimuli inflammatoires (production de cytokines dont le $\text{TNF}\alpha$), qui vont à leur tour favoriser l'expression de MHC-II (complexe d'histocompatibilité de classe II) au niveau de la microglie et favoriser son activation. Celle-ci participe alors à la formation d'oxyde nitrique (NO) qui va induire un stress oxydatif au niveau du cerveau, et interférer, entre autres, avec la transmission de l'influx nerveux affectant notamment la plasticité de la mémoire [59].

1.2.4.3 L'altération de l'autophagie

Comme expliqué au point 1.2.3.1, l'autophagie est un processus biologique impliqué dans la dégradation de macromolécules et dans la survie cellulaire. Cependant, en conditions de stress, l'autophagie non contrôlée peut induire la mort cellulaire. Une altération des mécanismes de l'autophagie pourrait contribuer au développement des différentes LSDs, comme démontrée pour la mucopolysaccharidose III A (MPSIIIA) définie par un déficit en héparane N-sulfatase. En effet, une étude réalisée sur un modèle murin de la MPSIIIA a montré que cette LSD est caractérisée par une accumulation d'autophagosomes au sein des cellules neurales suite à une perturbation de la fusion autophagosome-lysosome. L'autophagie ainsi altérée conduit à une accumulation de protéines polyubiquitinées et de mitochondries non fonctionnelles dans la cellule induisant, *in fine*, la mort cellulaire [60].

1.2.4.4 L'altération des fonctions d'autres organites

Il a été montré dans plusieurs études que les fonctions de différents organites, tels que les mitochondries et le RE, sont affectées dans plusieurs LSDs. En effet, dans la maladie de Batten, une NCL causée par la mutation du gène *cln3*, les mitochondries des cellules neurales de souris *cln3*^{-/-} sont anormalement allongées et ont une production réduite d'ATP [61]. De même, dans la MLIV, le réseau mitochondrial de fibroblastes de patients atteints de la maladie présente un aspect plus fragmenté et les mitochondries ont une capacité réduite à tamponner une augmentation de la concentration en calcium cytosolique libre (alors que la

concentration matricielle mitochondriale de base en calcium est comparable) [43]. Ces auteurs ont également montré que cette modification est généralement associée à une sensibilité accrue à l'apoptose induite. Par ailleurs, dans la maladie de Niemann-Pick de type C1, le taux de cholestérol est anormalement élevé dans les membranes mitochondriales de cellules neurales de souris NPC1, affectant le potentiel de membrane et la production d'ATP dans ces cellules [62].

Dans certains cas, la surcharge lysosomale interfère avec les fonctions du RE, induisant l'accumulation de protéines non-repliées au sein de l'organite et enclenchant la réponse UPR (unfolded protein response) [41]. L'activation de la réponse UPR a pour but de diminuer la traduction des protéines et d'activer l'expression de gènes codant pour des chaperonnes résidentes du RE et des protéines impliquées dans le repliement des protéines telles que BiP (Binding immunoglobulin Protein) et PDI (protein disulfide isomerase), dans le but de diminuer l'accumulation de protéines mal repliées dans le RE [63]. Toutefois, dans certaines conditions, la réponse UPR peut induire l'apoptose. Ainsi, une étude réalisée sur la gangliosidose à GM1 a montré que l'accumulation de gangliosides GM1 au sein des lysosomes de neurones de souris GM1 conduit à l'accumulation de ces gangliosides dans le RE induisant une dérégulation de l'homéostasie du RE suivie d'une déplétion du calcium. Ce dernier est connu comme étant un inducteur de la réponse UPR, et son activation dans le cerveau des souris GM1 est liée à la dégénérescence des cellules neurales [63].

Dans la mucopolysaccharidose de type III B (MPSIIIB), une LSD caractérisée par un déficit en α -N-acétylgucosamidase et caractérisée par des troubles mentaux, la surcharge affecte la biogenèse et la morphologie en ruban de l'appareil de Golgi [64]. La désorganisation de l'appareil de Golgi a été mise en évidence sur un modèle murin de la MPSIIIB et serait responsable de la neurodégénérescence associée à la pathologie [64].

Tandis que l'étiologie de la LINCL est bien caractérisée, peu d'informations sont disponibles concernant les voies de signalisation et les mécanismes moléculaires affectés par un déficit en TPP-1. Au vu des différentes perturbations engendrées par d'autres LSDs, telles qu'une modification du trafic lipidique [41], une altération de l'autophagie [60], ou encore l'altération des fonctions d'autres organites [62,63], il est raisonnable de penser que la LINCL provoque également ces types d'altérations. Au cours de ce travail, nous allons plus particulièrement nous intéresser aux effets potentiels d'un déficit en TPP-1 sur la population mitochondriale en étudiant et en caractérisant la structure et l'état fonctionnel de cet organite dans des cellules fibroblastiques LINCL.

1.3 Les mitochondries :

1.3.1 Généralités

Les mitochondries sont des organites présentant une morphologie très dynamique [65]. Elles sont caractérisées par une double bicouche lipidique composée d'une membrane mitochondriale externe (MME) et d'une membrane mitochondriale interne (MMI). Celles-ci assurent la séparation de deux compartiments internes dont l'espace inter-membranaire renfermant, entre autres, différents facteurs pro-apoptotiques tels que le cytochrome c, l'endonucléase G, le facteur AIF (Apoptosis inducing factor) et les pro-caspases. La matrice mitochondriale renferme l'ADNmt, les ribosomes et diverses enzymes impliquées dans des processus biologiques comme le cycle de Krebs ou la β -oxydation des acides gras [66]. La MME possède de nombreuses porines assurant le passage de petites molécules et métabolites (poids moléculaire inférieur à 1500 Da) [67] à l'intérieur de la mitochondrie. La MMI est caractérisée par la présence de nombreuses circonvolutions appelées les crêtes mitochondriales qui contiennent les complexes des phosphorylations oxydatives. Elle est

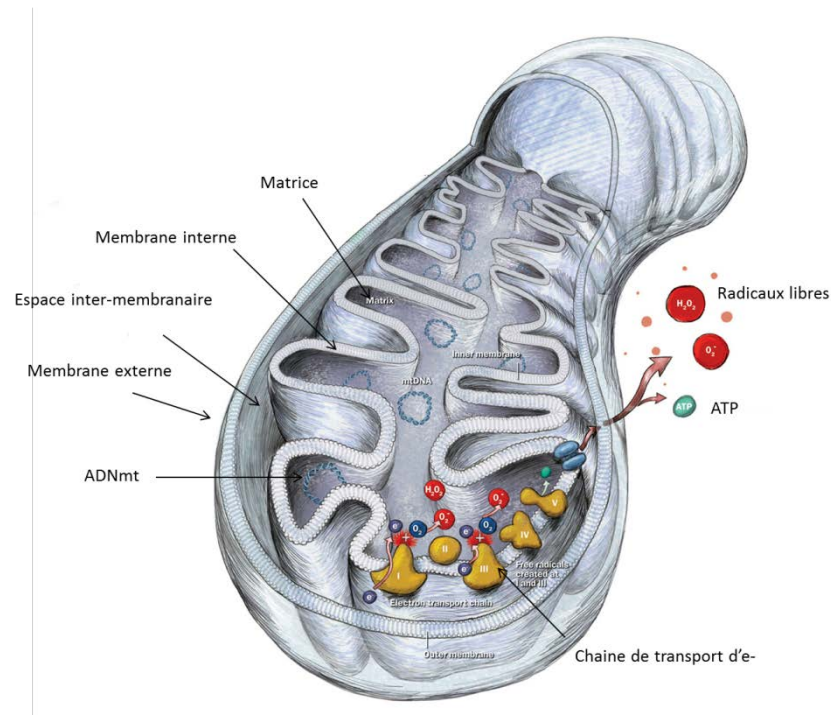


Figure 1.10. Représentation schématique d'une mitochondrie

La mitochondrie est caractérisée par la présence de deux membranes, à savoir la membrane mitochondriale externe (MME) et la membrane mitochondriale interne (MMI). Celles-ci assurent la compartimentalisation de l'organite, délimitant l'espace inter-membranaire et la matrice. Au sein de la matrice est retrouvé l'ADNmt, qui est circulaire et présent en grand nombre de copies. L'espace inter-membranaire permet la formation d'un gradient de protons de part et d'autre de la membrane interne qui génère un potentiel électrochimique (et une différence de pH) qui caractérise la force protonmotrice, qui sera utilisée par le complexe V (Fo-F1-ATPsynthase) de la chaîne respiratoire afin de produire de l'ATP. La mitochondrie représente également un site important de la formation de ROS (radicaux anioniques superoxydes) au sein de la cellule suite à la libération d'électrons depuis la chaîne respiratoire.

D'après <http://www.immortalhumans.com/increasing-longevity-by-disabling-engines-of-mitochondria/>

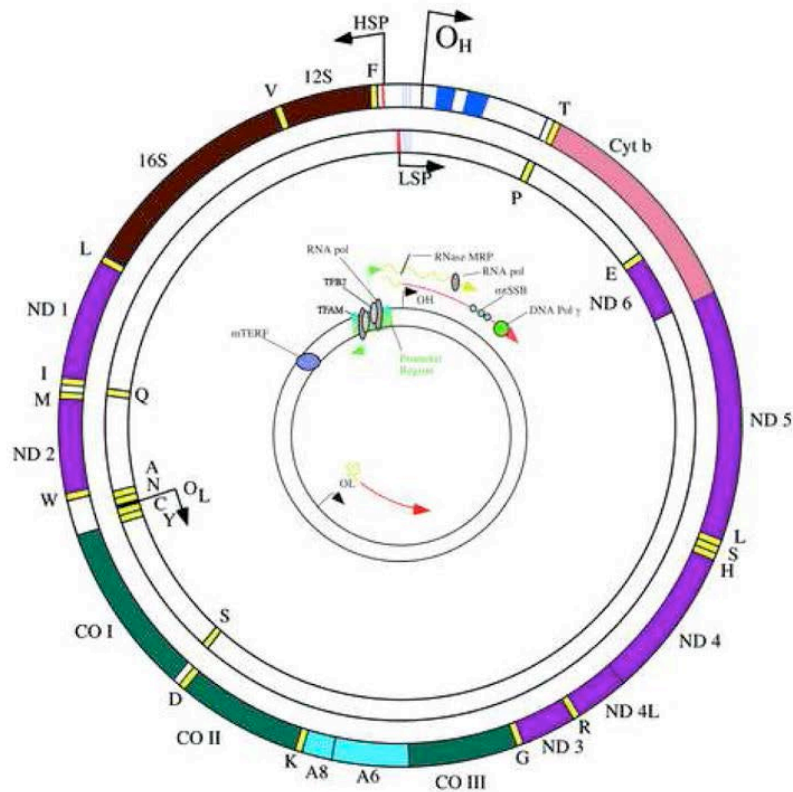


Figure 1.11. Représentation du génome mitochondrial

Le génome mitochondrial circulaire est caractérisé par la présence des promoteurs HSP et LSP présents sur un des deux brins de l'ADNmt. La transcription de l'ADNmt est essentiellement régulée par les facteurs de transcription Tfam et mTFB2 qui se lient sur chacun de ces promoteurs. Le facteur Tfam est également impliqué dans la réplication de l'ADNmt. Celle-ci est complexe car elle nécessite d'abord la transcription d'une amorce ARN nécessaire à l'initiation de la réplication par la polymérase ARN mitochondriale (POLRMT) au niveau de l'origine de réplication O_H. Pour ce faire, l'amorce ARN est premièrement clivée par une endoribonucléase MRP afin de générer une extrémité 3'-OH libre. L'ADNmt est ensuite répliqué au moyen de POLγ qui est assistée par l'hélicase TWINKLE et les protéines mtSSB, permettant de maintenir les brins d'ADN désappariés.

Abréviations: HSP: Heavy Strand Promoter, LSP: Light Strand Promoter, O_H: Origin of replication H strand, ND: NADH-ubiquinone reductase (ND1-6 = sous-unités 1 à 6 du complexe I), Cyt b: Cytochrome b (complexe III), CO Cytochrome Oxydase: (CO1-6 = sous-unités 1 à 6 du complexe IV), A6-A8: ATPase 6 et 8 (complexe V), SSBmt: Single Strand Binding protein, Tfam/MTFA: Mitochondrial Transcription Factor A, mTFB2: Mitochondrial transcription factor B 2, POLRMT: polymérase ARN mitochondriale, MRP: Mitochondrial RNA processing (D'après Diaz et Moraes, 2008)

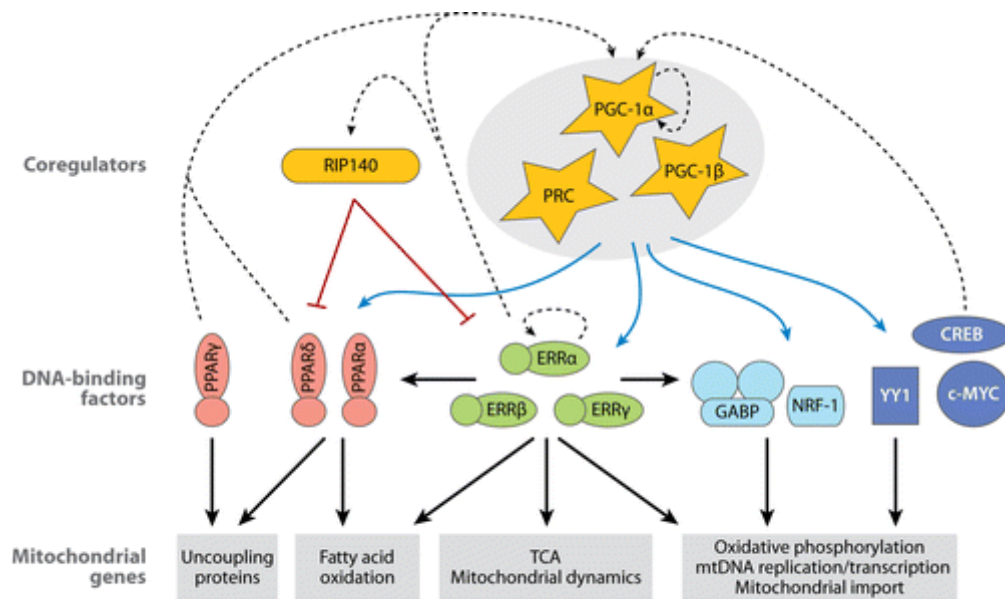


Figure 1.12. Les principaux facteurs de transcription impliqués dans la biogenèse mitochondriale

Différents facteurs de transcription nucléaires (ex : ERRs, PPARs, CREB, NRF-1, NRF-2 (= GABP), YY1, cMyc) et co-activateurs (PGC-1 α , β , PRC, RIP140) participent à la régulation de la biogenèse mitochondriale. Ainsi, les facteurs PPARs régulent la transcription des gènes codant pour les protéines UCPs et les protéines impliquées dans la β -oxydation des acides gras. Les facteurs ERRs activent les gènes codant pour les protéines du cycle de Krebs, tandis que, NRF-1, GABP/NRF-2 et YY1 activent les gènes codant pour des protéines prenant part à la phosphorylation oxydative, à la transcription et à la réplication de l'ADNmt, ainsi qu'à l'importation des protéines mitochondriales. L'activité de ces différents facteurs de transcription est également régulée par l'action de plusieurs co-activateurs, à savoir PGC-1 α , PGC-1 β , PRC et RIP140.

Abréviations: CREB : cAMP Response Element Binding protein, NRF-1: Nuclear Respiratory Factor 1, GABP: GA Binding Protein (=NRF-2), YY1: Ying Yang 1, UCPs UnCoupling Proteins, PPARs: Peroxysome Proliferator-Activated Receptors, PGC1 α , β : Peroxysome-proliferator-activated-receptor γ Co-activator 1 α , β , PRC : PGC-1-Related Co-activator, RIP140: Receptor Interacting Protein 140 (D'après Hock et Kralli, 2009)

également plus imperméable que la MME et ce, en raison de son enrichissement en cardiolipine (**Figure 1.10**) [68].

Les mitochondries dérivent de l'endosymbiose d' α -protéobactéries du genre *Rickettsia* (gram-négatives) au sein des cellules eucaryotes [69]. Elles possèdent donc leur propre génome en copies multiples. L'ADNmt est un ADN circulaire d'environ 16,5 kb chez l'homme et la souris, qui comprend 37 gènes codant pour 22 ARN de transferts (ARNt), 13 sous-unités des complexes de la chaîne de transport mitochondriale (voir point 1.3.3), et 2 ARN ribosomiaux (ARNr) nécessaires pour la traduction des protéines mitochondriales. Les autres protéines mitochondriales (plus de 95 %) sont encodées par des gènes nucléaires, et synthétisées dans le cytosol avant d'être importées dans la mitochondrie (voir point 1.3.2) [70,71,72]. Bien que n'étant pas enroulé autour de protéines histones, l'ADNmt est associé à différentes protéines présentes dans la matrice et MMI, formant ainsi des nucléoïdes [71]. Certaines des protéines constitutives du nucléoïde participent à la réplication et à la transcription de l'ADNmt, et incluent entre autres chez la levure le facteur de transcription A (Tfam), l'hélicase TWINKLE, la polymérase γ , et les protéines mtSSB qui se lient aux structures simple brin [71].

1.3.2 La biogenèse mitochondriale

L'abondance de la population mitochondriale dans une cellule à un moment donné dépend d'un équilibre entre la dégradation et la biogenèse de l'organite [73]. La biogenèse mitochondriale est un processus complexe car celle-ci implique la coopération de deux génomes (nucléaire et mitochondrial) et l'expression coordonnée de près de 1500 gènes [74]. Elle est caractérisée par la croissance et la division de mitochondries préexistantes et est particulièrement stimulée lors d'une demande accrue en énergie comme dans les cellules musculaires en réponse à la contraction musculaire, lors de la division et de la différenciation cellulaire, ou suite à l'exposition à un stress environnemental comme l'exposition au froid. La biogenèse mitochondriale est un processus fortement régulé et induit une variation de l'abondance, de la taille et de la masse des mitochondries [70].

D'un point de vue moléculaire, différents facteurs de transcription et co-activateurs participent à la régulation de la biogenèse mitochondriale [74]. La transcription de l'ADNmt génère des ARN polycistroniques et est régulée par les facteurs mtTFB1, mtTFB2 (mitochondrial factor B1 et B2) et le facteur de transcription Tfam/mtTFA (Mitochondrial Transcription Factor A) qui se lient aux promoteurs HSP (Heavy Strand Promoter) ou LSP (Light Strand Promoter) présents sur un des deux brins de l'ADNmt (**Figure 1.11**) [70,71]. Le facteur Tfam est présent en grande quantité et serait entre autre responsable de l'organisation de l'ADNmt en nucléoïdes [71]. Ce facteur est codé par un gène nucléaire présent sur la région chromosomique 10q21.1[75], et sa région promotrice possède des sites de liaison à NRF-1 et 2 (Nuclear Respiratory Factor 1, 2) [70]. Les facteurs NRF-1 et 2, tout comme les co-activateurs PGC-1 α , β (Peroxisome-proliferator-activated-receptor γ Coactivator 1 α , β) et PRC (PGC-1 Related Coactivator) participent à l'activation de l'expression de différents gènes mitochondriaux [71]. PGC-1 α ne possède pas de site de liaison à l'ADN mais se lie à différents facteurs de transcription impliqués dans la biogenèse de l'organite dont NRF-1 et 2, ERR α (Estrogen-Related Receptor α), PPARs (Peroxisome Proliferator Activated Receptors) et des récepteurs aux hormones thyroïdiennes T3 et T4, afin de les activer et d'induire la biogenèse mitochondriale (**Figure 1.12**).

Le mécanisme exact de la réplication de l'ADNmt n'est pas encore bien compris à l'heure actuelle. Il existe d'ailleurs deux modèles expliquant la réplication de l'ADNmt, le premier suggérant une réplication simultanée des deux brins de l'ADNmt [76], et le deuxième selon lequel la réplication de l'ADNmt est unidirectionnelle et asynchronisée [77]. Toutefois, les deux modèles s'accordent à dire que la réplication de l'ADNmt est associée à la

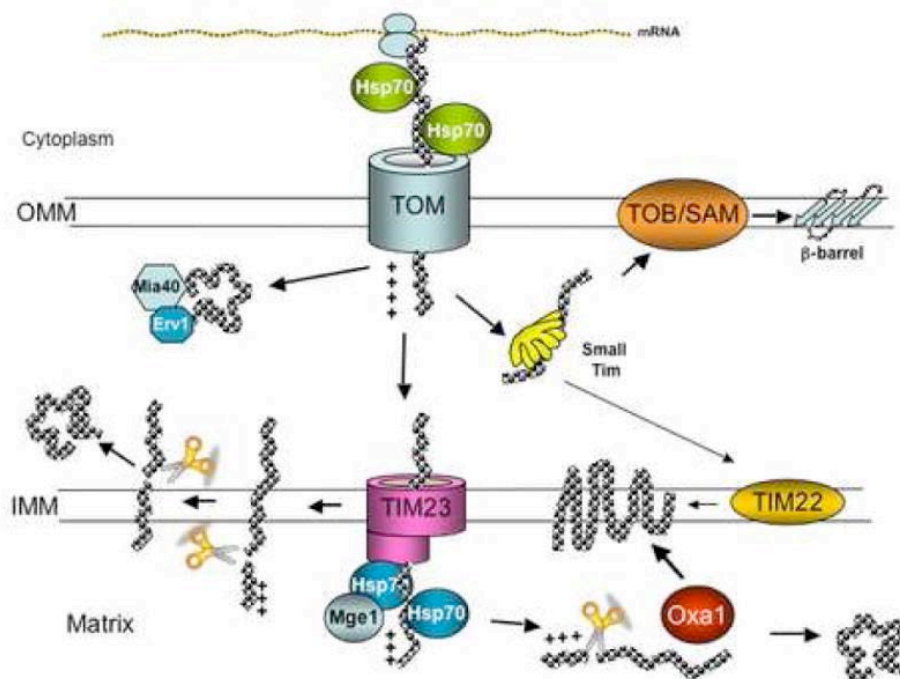


Figure 1.13. Importation et transport des protéines au sein de la mitochondrie

Les protéines mitochondriales sont synthétisées dans le cytosol sous la forme de précurseurs, et sont associées à des chaperonnes (dont Hsp70 et 90) afin de les maintenir sous forme non repliées. Pour les protéines à destination de la matrice, les précurseurs possèdent une séquence d'adressage mitochondriale de 10 à 80 acides aminés généralement située au niveau de l'extrémité N-terminale. Cette séquence est composée d'acides aminés hydrophobes et chargés positivement. Le transport des protéines mitochondriales est médié par deux complexes translocases, à savoir le complexe TOM (Translocase of the Outer Membrane) formé de protéines réceptrices et d'assemblage comme les protéines Tom5, 6, 7, 20, 22, et 70 et du pore d'importation avec la protéine canal Tom40. Le complexe TIM23 (Translocase of the Inner Membrane) est composé des protéines Tim 17, 21, 23 et 50. Les protéines Tom20, 22 et 70 sont des récepteurs de surface reconnaissant les précurseurs et interagissant avec les chaperonnes qui y sont associées. La protéine Tom40 forme un pore dans la MME et permet le passage de ces précurseurs au travers de la membrane. Une fois dans l'espace inter-membranaire, les précurseurs sont pris en charge par le complexe TIM23 et un autre complexe « moteur », composé de Tim44, Tim16, Tim14, Mge1 (Mitochondrial GrpE 1) et mtHsp70, assurant leur translocation dans la matrice. Ce processus nécessite de l'ATP et un potentiel de membrane mitochondrial élevé ($\Delta\psi$ m). Une fois dans la matrice la séquence d'adressage est clivée et la protéine acquiert sa conformation grâce à l'action de mtHsp70 [4].

Les protéines de la MMI, possèdent des séquences d'adressage dans la séquence de la protéine (domaines membranaires hydrophobes) et sont également importées au moyen des complexes TOM-TIM23. Les protéines possédant des domaines transmembranaires sont stoppées au niveau du complexe TIM23 puis transférées latéralement. Certaines protéines de la MMI arrivant dans la matrice mitochondriale sont ensuite réintégrées en MMI au moyen de la protéine Oxa1 (Cytochrome Oxydase Assembly 1).

Un troisième mode d'adressage existe pour les protéines MMI, dans lequel les protéines transloquées dans l'espace inter-membranaire sont prises en charge par des petites protéines Tim (Tim9, 10 et 12) et ensuite transférées vers un autre complexe translocase TIM22 (composé de Tim18, 22 et 54), assurant leur intégration en MMI de façon dépendante du potentiel de membrane.

Les protéines associées à la MME sont également prises en charge par le complexe TOM et les petites protéines Tim, qui les guident cette fois-ci vers un complexe translocase TOB (Translocase of Outer membrane β -barrel proteins) composé des protéines Tom37, 38 et 50. Ce complexe TOB assure l'insertion des protéines en MME.

Pour terminer, les protéines de l'espace inter-mitochondriale y sont soit ciblées via les complexes TOM-TIM23, où la forme mature est clivée par protéolyse puis libérée dans l'espace inter-membranaire ; soit via le complexe TOM et les protéines Mia40 (Mitochondrial inter-membrane space assembly 40) et Erv1 (Essential for respiration and viability 1) assurant la maturation des protéines au sein de l'espace inter-mitochondrial. (D'après Diaz et Moraes, 2008)

transcription du promoteur LSP, ce qui génère une amorce ARN permettant d'initier la réplication à l'origine de réplication O_H. La POL γ , associée à l'hélicase TWINKLE et aux protéines SSBmt assurent la réplication de l'ADNmt [71].

Etant donné que plus de 95 % des protéines mitochondriales sont codées par des gènes nucléaires [74], la maturation et le transport de ces protéines à leur destination cible (matrice, MMI, MME et espace intermembranaire) nécessitent différents mécanismes. Ceux-ci sont brièvement présentés à la **Figure 1.13**. De même, la synthèse des lipides constitutifs des membranes mitochondriales requière la synthèse de lipides au sein de la mitochondrie mais également au sein du RE [78,79]. Ainsi, approximativement 45 % des phospholipides mitochondriaux, dont principalement l'acide phosphatidique, la phosphatidyléthanolamine et la cardiolipine (un constituant essentiel et important de la MMI) sont synthétisés par l'organite [78]. Le transport de lipides depuis le RE nécessite donc la formation de jonctions entre le RE et les mitochondries. Ce rapprochement entre les deux organites est médié par la protéine Mitofusin 2, une GTPase présente à la fois en surface mitochondriale (MME) et dans la membrane du RE, qui forment des homodimères entre les deux organites [80]. Les endroits de contacts physiques entre le RE et la mitochondrie sont appelés MAMs (Mitochondria-Associated Membranes) et sont nécessaires pour l'échange de calcium et de métabolites entre les deux organites, en plus du transport de lipides [81].

Une altération de la biogenèse mitochondriale peut, entre autres, contribuer au développement de maladies cardiaques [82] et neurodégénératives, comme c'est le cas dans la maladie d'Alzheimer [83]. En effet, il a récemment été montré que les niveaux d'expression des facteurs PGC-1 α , NRF1, NRF2 et Tfam sont significativement diminués dans les tissus nerveux des patients atteints de la maladie d'Alzheimer, ainsi que dans une lignée de cellules de neuroblastome M17 possédant la mutation suédoise (mutation du gène codant pour le précurseur de la protéine amyloïde) qui est utilisée comme modèle de la maladie d'Alzheimer [83].

1.3.3 Fonctions

Une des fonctions principales des mitochondries est la production d'ATP (Adénosine TriPhosphate) au moyen de la phosphorylation oxydative. De ce fait, les mitochondries sont souvent caractérisées comme étant les « centrales énergétiques » des cellules. Toutefois, cet organite est également essentiel à de nombreux autres processus cellulaires comme le contrôle de la production de ROS, l'homéostasie du calcium intracellulaire, la β -oxydation des acides gras, la synthèse du groupement hémique, le cycle de l'urée, le métabolisme hormonal et l'intégration de signaux de survie ou de mort cellulaire [56,84,85]

1.3.3.1 La phosphorylation oxydative

La production d'ATP à partir de glucose est assurée par 3 processus biologiques coordonnés comprenant la glycolyse, le cycle de Krebs (ou cycle de l'acide citrique) et la phosphorylation oxydative. Cette dernière est composée de la chaîne de transport des électrons et de la chimiosmose, processus par lequel le gradient de protons est converti en ATP par la F₀/F₁ ATPsynthase [86]. La chaîne de transporteurs d'électrons est composée de 4 complexes protéiques (I, II, III et IV) au travers desquels circulent les électrons (au cours de réactions d'oxydo-réduction) dans le but de récupérer l'énergie dégagée par ces réactions pour générer un gradient électrochimique de protons dans l'espace inter-membranaire. Cette accumulation de protons caractérise la force protonmotrice. Cette dernière sera utilisée par la F₀/F₁ ATPsynthase (ou complexe V) afin de synthétiser de l'ATP dans la matrice mitochondriale à partir d'ADP et de phosphate inorganique. L'ATP est finalement envoyé dans le cytosol au moyen de l'antiport ANT (Adenine Nucleotide Translocator) présent dans la MMI, et assurant un antiport entre ATP et ADP [86].

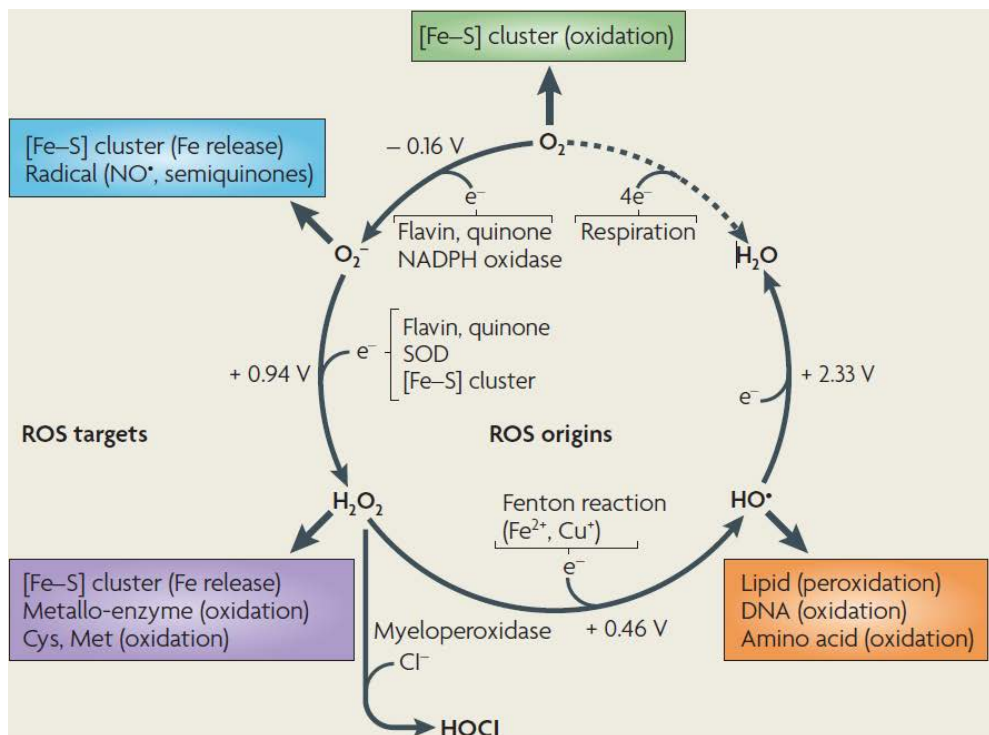


Figure 1.14. Génération de ROS et attaque des biomolécules

La réduction monovalente de l'oxygène mène à la formation de molécules radicalaires et très réactives dérivées de l'oxygène, les ROS. Les différents types de ROS formés, possédant des caractéristiques spécifiques (ex : stabilité, réactivité) réagiront préférentiellement avec certaines molécules présentes dans leur environnement. Pour commencer, l' $O_2^{\cdot-}$ est produit au cours de la respiration par une réaction catalysée par la NADPH oxydase. L' $O_2^{\cdot-}$ peut participer à la réaction d'oxydation du groupement Fe-S, menant à la libération de Fe et de H_2O_2 . L' $O_2^{\cdot-}$ est un composé très instable (temps de demi-vie de 10^{-9} s) et, outre sa faculté d'interagir avec Fe-S, il peut mener à la formation de H_2O_2 par dismutation spontanée. Ce dernier est stable et diffuse librement au travers des membranes. La réaction du H_2O_2 en présence de Fe^{2+} (réaction de Fenton) ou de Cu conduit à la formation du HO^{\cdot} , qui est très réactionnel et toxique. Le HO^{\cdot} participe alors à l'oxydation des molécules possédant des doubles liaisons comme la peroxydation de certains lipides l'oxydation des bases de l'ADN et de certains acides aminés des protéines. (D'après D'Autréaux et Toledano, 2007)

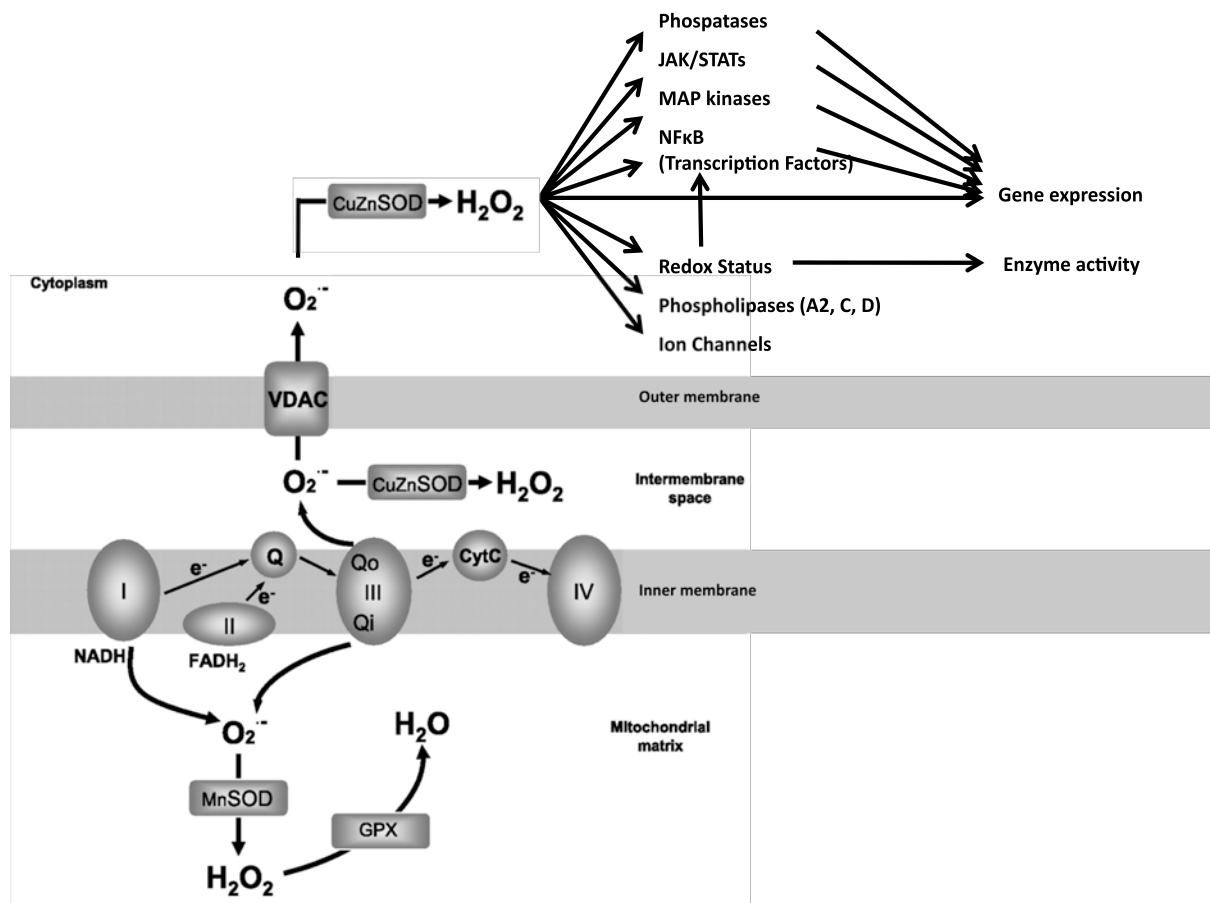


Figure 1.15. Participation des ROS en tant que messagers secondaires de nombreuses voies de signalisation cellulaire

L'O₂^{•-} est principalement généré à partir des complexes I et III de la chaîne respiratoire mitochondriale. Il est libéré à la fois dans la matrice mitochondriale et dans l'espace intermembranaire, tandis qu'une petite partie diffuse dans le cytosol via le VDAC. Différentes isoformes de la superoxyde dismutase (SOD) dismutent l'O₂^{•-} en H₂O₂ qui va agir comme messager secondaire dans différentes voies de signalisation cellulaire, dont la voie des phosphatases, la voie de JAK/STATs et des MAP kinases, dans l'activation de NFκB, de la phospholipase A2 ou encore dans la régulation de l'activité de canaux ioniques.

SOD : Superoxide Dismutase, VDAC : Voltage-Dependent Anion Channel, GPX : Glutathione Peroxidase (Modifiée à partir de Hancock *et al* 2001, et Zhang et Gutterman, 2007)

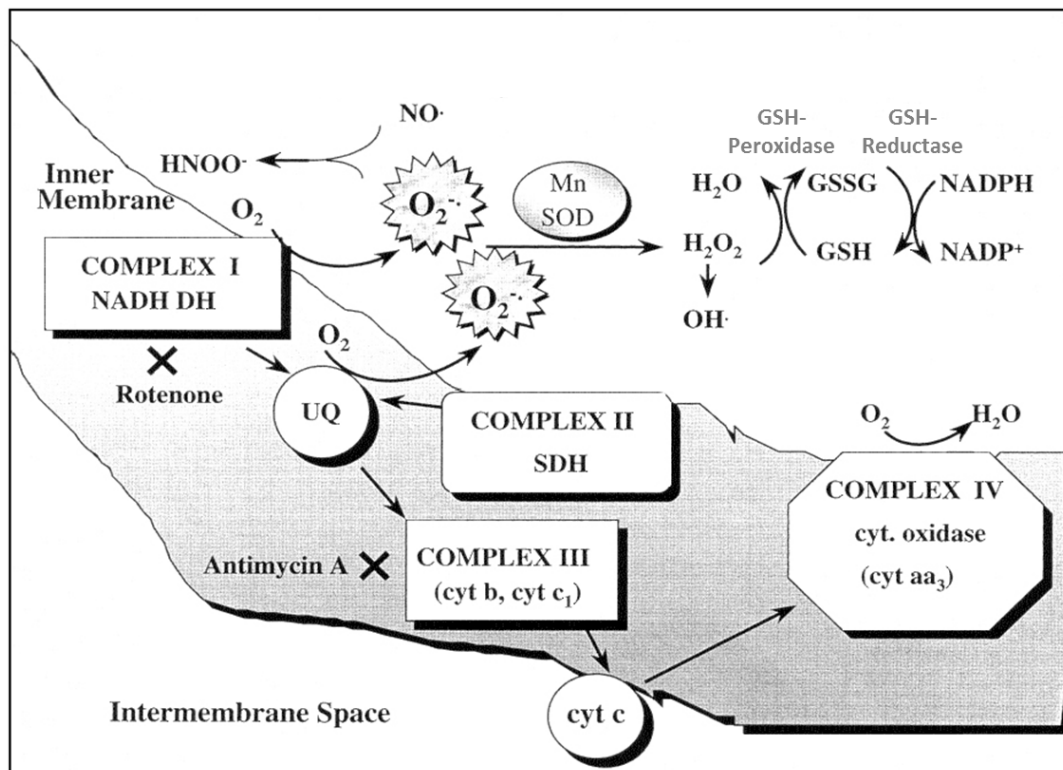


Figure 1.16. Production et détoxification des ROS par le Gluthation

Les ROS (Reactive Oxygen Species) sont principalement produits suite à la libération d'e⁻ au niveau des complexes I et III de la chaîne respiratoire mitochondriale. A forte concentration les ROS sont toxiques pour la cellule. De ce fait, il existe des mécanismes de détoxification enzymatiques et non enzymatiques afin de maintenir une faible concentration en ROS. Notons le glutathion (GSH), un composé importé au sein de la mitochondrie par les transporteurs de l'oxoglutarate et du dicarboxylate. Le glutathion est utilisé par la glutathion peroxydase afin de catalyser la réduction de l'H₂O₂ en H₂O. Cette réaction conduit à la liaison de deux molécules de glutathion oxydées (GSSG) par un pont disulfure. Celles-ci sont ensuite recyclées au moyen de la glutathion réductase qui catalyse la réaction de réduction des GSSG à partir du NADPH. (D'après Murphy *et al.* 1999)

1.3.3.2 La régulation de la production d'espèces radicalaires dérivées de l'oxygène

Les mitochondries constituent une source importante pour la production de ROS et ce, même en conditions physiologiques puisqu'environ 2-3 % de l'oxygène est utilisé pour la production de radicaux superoxydes. Cette production résulte principalement de la libération d'électrons depuis les complexes I et III de la chaîne respiratoire mitochondriale. Les ROS caractérisent toutes les espèces chimiques formées par une réduction incomplète de l'oxygène (**Figure 1.14**). On retrouve ainsi l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle (HO^{\cdot}) [84,85]. L'anion superoxyde est donc dismuté en peroxyde d'hydrogène, qui diffuse au travers des membranes et peut alors intervenir dans différentes voies signalétiques (**Figure 1.15**) [87]. En effet, en conditions physiologiques, les ROS sont présents en faibles concentrations et agissent comme des messagers secondaires dans différentes voies de signalisation telles que les voies JAK/STATs (Janus Kinase/Signal Transducers and Activators of Transcription) et MAP kinases (Mitogen-Activated Protein Kinase), des kinases en amont de l'activation de facteurs de transcription comme les STATs et NF- κ B [87]. Une forte concentration en ROS résultant d'un dysfonctionnement mitochondrial (comme une altération du complexe IV de la chaîne respiratoire causée par l'accumulation du peptide amyloïde β dans la maladie d'Alzheimer, ou une mutation des protéines mitochondriales PINK et Parkin dans la maladie de Parkinson) renforce également le dysfonctionnement des mitochondries dans un cercle vicieux négatif, et pourrait contribuer à l'apparition de différents processus pathologiques dont le vieillissement, l'apoptose, l'oxydation des LDL lors de l'athérosclérose et la neurodégénérescence dans les maladies d'Alzheimer et Parkinson [56,84,85,88,89]. De même, il a été montré que les fibroblastes de patients atteints de la maladie de Niemann Pick de type C présentent des niveaux élevés en ROS et présentent une sensibilité accrue à l'apoptose comparée à celle des fibroblastes d'individus sains [41].

Différents mécanismes antioxydants sont néanmoins mis en place par la cellule pour maintenir une faible concentration en ROS, empêcher les dommages (scavengers) ou réparer les dommages cellulaires. On retrouve notamment le glutathion, transporté au sein de la mitochondrie par des récepteurs à l'oxoglutarate et au dicarbocylate, et qui est impliqué dans la réduction de l' H_2O_2 en H_2O ([90]) (**Figure 1.16**). De même, les superoxydes dismutases MnSOD/SOD2 (mitochondriales) et Cu/ZnSOD1 (cytosoliques) participent à la dismutation de l' H_2O_2 en H_2O [90]. La peroxyrédoxine 3 est également retrouvée dans la matrice mitochondriale et possède quant à elle un résidu cystéine sensible à l'oxydation par l' H_2O_2 [91]. D'autres molécules incluant la coenzyme Q-10, les polyamines, les vitamines C et E et la taurine ont également été rapportées comme ayant des fonctions anti-oxydantes au sein des mitochondries [90].

Cependant, ces mécanismes de défense peuvent être altérés dans certaines LSDs. En effet, en conditions normales, en réponse à un stress oxydatif, la protéine APE1/Ref-1 (apurinic/aprimidinic endonuclease 1/redox effector factor) est surexprimée et transloquée au niveau du noyau où elle prend alors part au système de réparation de l'ADN et joue un rôle de co-activateur transcriptionnel (pour notamment les facteurs AP-1, NF κ B, p53 qui ont des actions anti-oxydantes) [92]. Cette protéine joue donc un rôle essentiel dans la réponse adaptative à un stress oxydatif. Cependant, une étude réalisée sur la maladie de Gaucher a mis en évidence une augmentation de la concentration en ROS dans les fibroblastes de patients atteints de la maladie comparée à celle mesurée pour des individus sains, et a montré que ces cellules ne possèdent pas de réponse adaptatrice APE1/Ref-1 fonctionnelle [93]. De même, un stress oxydatif est associé à la pathogenèse de la maladie de Batten, et il a été montré que les lymphoblastes de patients atteints de la maladie ont des concentrations réduites en superoxyde dismutase 1 (SOD-1) [94].

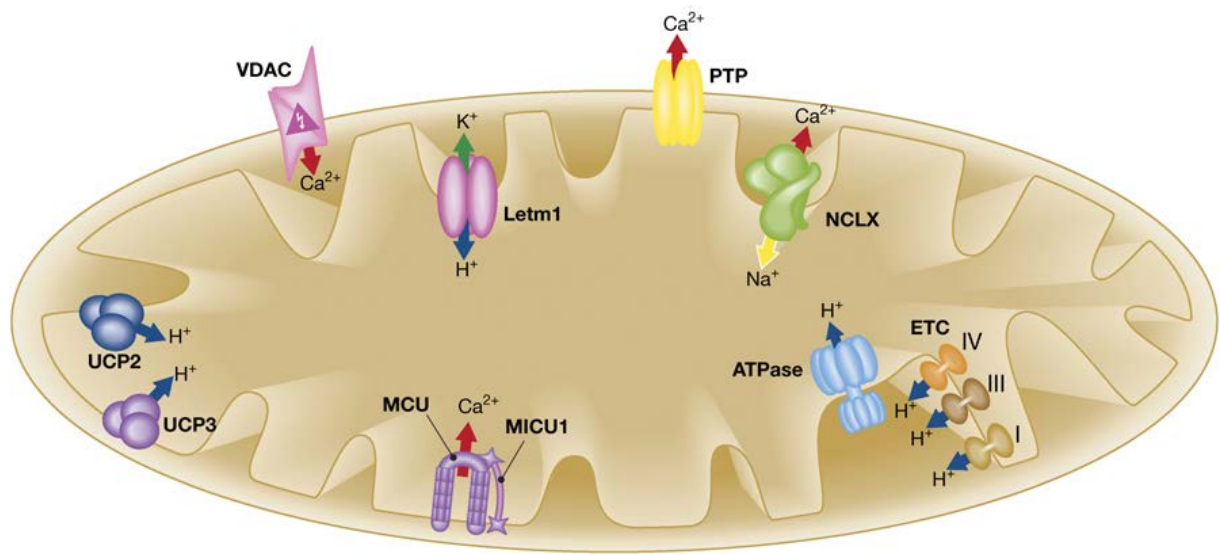


Figure 1.17 Représentation schématique des différents transporteurs mitochondriaux pour les ions Ca^{2+} , Na^+ , et H^+

Le transport de calcium à l'intérieur de la mitochondrie est dépendant du potentiel de membrane mitochondriale interne ($\sim 180 \text{ mV}$, négatif dans la matrice) et implique la participation de deux transporteurs. Dans un premier temps, le canal VDAC assure le transport du Ca^{2+} depuis le cytosol jusqu'à l'espace intermembranaire. Le transport jusqu'à la matrice est ensuite médié par l'uniporteur (MCU). La protéine MICU1 a récemment été identifiée comme étant un senseur de l'uniporteur et régule son activité. L'efflux de calcium est pour sa part assuré par différents mécanismes dont la sortie du Ca^{2+} médiée par l'antiport $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ NCLX et la libération de calcium par le mPTP.

Abréviations: VDAC : Voltage-Dependent Anion Channel ; MCU : Mitochondrial calcium uniporter ; MICU1 : Mitochondrial Ca^{2+} uptake 1 ; NCLX : $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger ; Letm1: Leucine-zipper EF-hand containing transmembrane protein 1; UCP2, 3: Uncoupling protein 2, 3; mPTP : mitochondrial permeability transition pore ; ETC : Electron Transport Chain (D'après Drago *et al.* 2011)

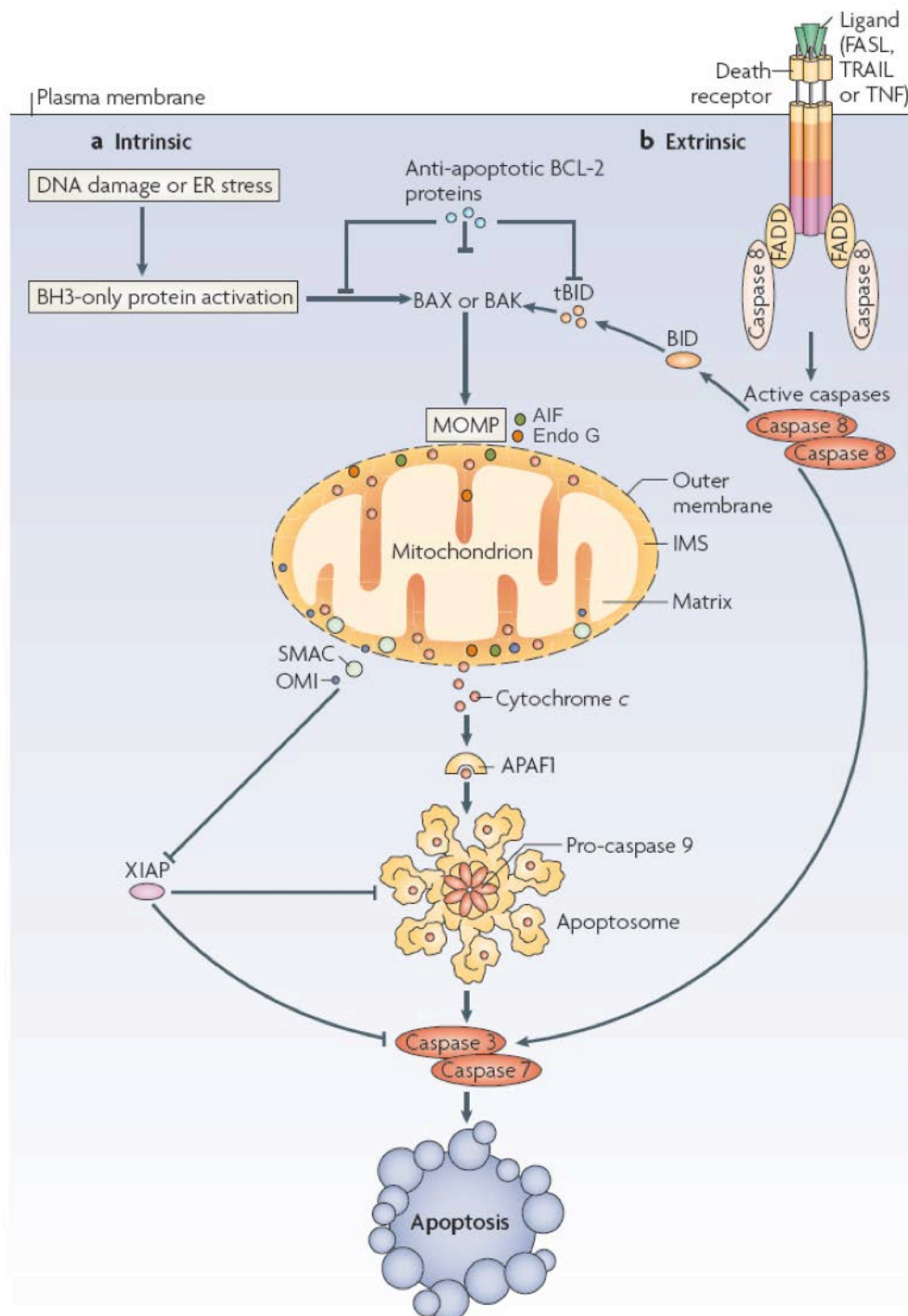


Figure 1.18. Déclenchement de l'apoptose par voie intrinsèque et extrinsèque

La voie intrinsèque peut être initiée en réponse à des dommages à l'ADN, un stress oxydatif ou un manque en facteurs de croissance. La réponse à ces conditions de stress se traduit par une diminution du potentiel de membrane mitochondriale et la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe, permettant la libération de facteurs pro-apoptotiques dans le cytosol. Au vue de son importance dans l'initiation de l'apoptose, la perméabilisation de la MME est fortement régulée et ce grâce à la présence de protéines pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. En réponse à un stress, les protéines pro-apoptotiques Bax (Bcl-2-associated X protein) et Bak (Bcl-2 homologous antagonist/killer) sont activées, changent de conformation et s'assemblent en homo-ou hétérooligomères pour former des pores dans la MME. Ceux-ci permettent la libération sélective de

protéines pro-apoptotiques [5,6]. Parmi celles-ci on retrouve le cytochrome *c*, le facteur AIF (Apoptosis-Inducing Factor), les endonucléases G et CAD (Caspase-activated DNase), les protéines Smac/Diablo (Second mitochondria-derived activator of caspase/Direct inhibitor of apoptosis protein (IAP) binding protein with low PI), et Htr-2/Omi (High temperature requirement protein-2) [7,8]. Une fois dans le cytosol, le cytochrome *c* se lie au facteur APAF1 (Apoptotic Protease Activating Factor 1), induisant la modification conformationnelle de ce dernier et son oligomérisation pour former l'apoptosome. Celui-ci recrute alors la caspase 9 et favorise sa dimérisation et son activation. La caspase 9 active finalement les caspases effectrices 3 et 7 qui sont les médiateurs de l'apoptose. Les protéines Diablo et Omi vont inhiber les protéines XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis proteins) normalement liées aux caspases actives et qui assurent ainsi une régulation négative de l'apoptose en inhibant/induisant la dégradation des caspases. Les endonucléases G et la protéine AIF pourront être transloquées au niveau du noyau et fragmenter l'ADN d'une manière indépendante des caspases [7,8].

L'initiation de l'apoptose par la voie extrinsèque nécessite la liaison d'un ligand (FasL, TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand), TNF α) à un des récepteurs de la famille TNF présents en membrane plasmique et connus comme étant les récepteurs de mort. La liaison ligand-récepteur induit le recrutement de la protéine FADD (Fas-associated death domain protein) qui possède un domaine de mort nécessaire au recrutement et à l'activation de la caspase 8. Celle-ci active ensuite les caspases 3 et 7, mais également la protéine Bid (BH3-interacting domain death agonist) qui devient tBid et qui se fixe à la MME dans le but d'induire sa perméabilisation et la libération de facteurs pro-apoptotiques [8]. (D'après Tait et Green, 2010)

1.3.3.3 L'homéostasie du calcium

Le calcium cytosolique libre joue un rôle important dans la régulation de différentes réponses physiologiques dont la prolifération cellulaire, l'expression de gènes, l'activation d'enzymes et la libération de neurotransmetteurs dans les cellules neuronales au moyen des canaux voltage-dépendants [56,95,96]. Le calcium mitochondrial et matriciel (à faible concentration) participe quant à lui à l'activation de 3 déshydrogénases du cycle de Krebs (pyruvate-, α -ketoglutarate-, et isocitrate- déshydrogénases) et est donc essentiel à la régulation du métabolisme et de la bioénergétique mitochondriale. De plus, la mitochondrie participe à la régulation de la concentration du calcium cytosolique libre cellulaire [96]. Cette dernière fonction est très importante pour éviter qu'une augmentation de la concentration en calcium cytosolique ne devienne toxique pour la cellule et n'active des mécanismes de mort cellulaire via l'activation d'enzymes hydrolytiques dépendantes du calcium comme les calpaïnes [96]. La concentration en calcium mitochondriale dans la matrice varie de 0,1 à 2 μ M [97] et différents transporteurs sont impliqués dans les flux calciques au travers de la mitochondrie (**Figure 1.17**). Au sein de la mitochondrie, si une légère augmentation de la concentration en calcium stimule le métabolisme énergétique et la production d'ATP, une concentration excessive peut mener à l'activation de l'apoptose. Ce dernier permet la libération du cytochrome *c* dans le cytosol, activant alors la voie des caspases conduisant à l'apoptose (voir point 1.3.3.4) [56]. Une élévation de la concentration du calcium au sein de la matrice mitochondriale est aussi connue pour induire la production de ROS en réponse à une diminution du potentiel de membrane provoquée par l'entrée massive du calcium dans la matrice [97]. Toutefois, une forte concentration en calcium induit également la déphosphorylation et l'activation de la superoxyde dismutase à manganèse (MnSOD/SOD2). Cette enzyme dismute alors l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) en O_2 et H_2O_2 .

Le calcium mitochondrial joue donc un rôle important dans l'homéostasie des ROS et la production d'ATP [98]. De plus, il semblerait que le calcium mitochondrial soit impliqué dans la phosphorylation et la déphosphorylation de différentes protéines mitochondriales, et régule ainsi différentes fonctions de l'organite [98]. Toutefois, il a été montré dans la gangliosidose à GM1 que l'accumulation de gangliosides au niveau des MAMs des cellules neurales de souris GM1 cause une élévation de la prise de calcium par les mitochondries, induisant une perméabilisation de la MME suivie de l'induction de la mort cellulaire par apoptose [99]. De même, une altération de la morphologie mitochondriale des fibroblastes de peau de patients atteints de la MLIV affecte la capacité des mitochondries à tamponner une augmentation de la concentration en calcium cytosolique, induisant également une sensibilité accrue des cellules à l'apoptose [43].

1.3.3.4 La mort cellulaire par nécrose ou apoptose

Les mitochondries jouent également un rôle important dans la régulation de la survie cellulaire ou dans le contrôle des processus de mort cellulaire par apoptose ou nécrose. L'apoptose constitue la mort cellulaire programmée de type I (PCDI) (l'autophagie étant le type de mort cellulaire programmée de type II (PCDII)) qui a pour but physiologique de maintenir l'homéostasie des tissus en éliminant les cellules produites en excès et/ou endommagées [100]. Elle peut être initiée par deux voies différentes mais interconnectées à savoir, la voie intrinsèque et la voie extrinsèque. Celles-ci sont schématisées à la **Figure 1.18**.

Comme mentionné précédemment, les dommages mitochondriaux (morphologie/fonctions) retrouvés dans plusieurs LSDs (telles que la maladie de Batten, la MLVI, la gangliosidose à GM1, la MPSIIIA et la maladie de Niemann Pick de type A) s'accompagnent généralement d'une sensibilité accrue des cellules à l'apoptose [41,43,58,60,99].

Les mitochondries sont également impliquées dans l'initiation de la nécrose. En fait, la membrane MME possède des pores mPTP qui sont normalement présents dans une

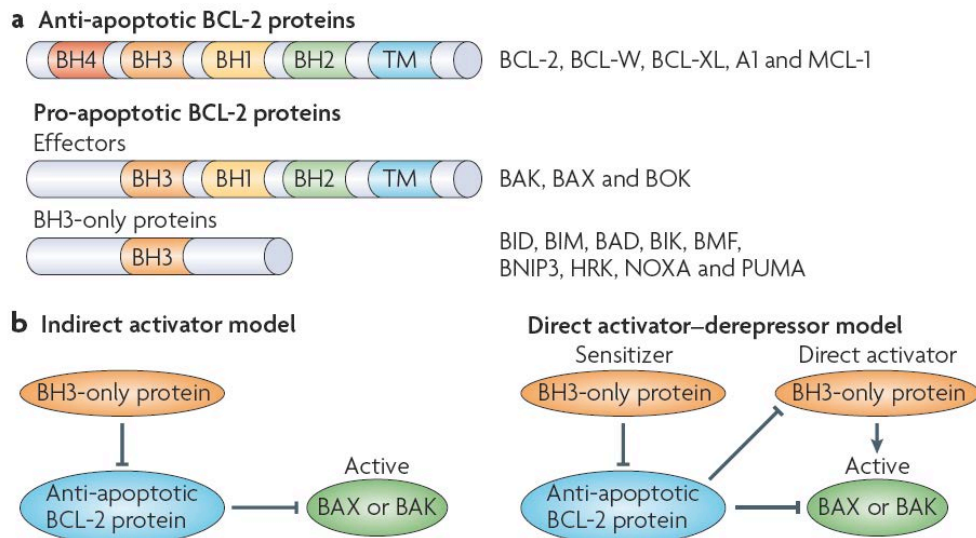


Figure 1.19. Les protéines de la famille Bcl2

a. La famille des protéines Bcl-2 (B cell lymphoma 2) regroupe un ensemble de protéines impliquées principalement dans la régulation de l'apoptose et, pour certaines d'entre elles dans la régulation de processus non apoptotiques tel que l'autophagie. Ces protéines partagent entre 1 à 4 domaines d'homologie à Bcl-2, à savoir les domaines BH1, H2, BH3 et BH4, permettant l'interaction physique entre ces protéines et à l'exception des protéines « BH3 only », un domaine transmembranaire (TM). Parmi les membres de la famille Bcl-2 on retrouve des protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2 et Bcl-XL (B cell lymphoma extra large), caractérisées par la présence des 4 domaines BH (à l'exception de Mcl-1 (myeloid cell leukemia sequence 1)). Ces protéines anti-apoptotiques ont pour but d'inhiber les protéines pro-apoptotiques en se liant à leur domaine BH.

Les protéines pro-apoptotiques regroupent Bax (Bcl-2-associated X protein) et Bak (Bcl-2 homologous antagonist/killer) et sont donc caractérisées par la présence des domaines BH1, 2 et 3 ; et les protéines BH3 only. L'activation ou la sur-expression des protéines « BH3-only » suite à un stress cellulaire favorise leur liaison au domaine BH3 des protéines anti-apoptotiques. Ces dernières libèrent alors les protéines pro-apoptotiques auxquelles elles étaient liées, ce qui induit l'apoptose.

b. Les modes d'activation directe et indirecte de Bax et Bak. Dans le modèle d'activation indirecte, les protéines BH3-only ne peuvent activer directement Bax et Bak. Néanmoins, ces protéines peuvent se lier à la protéine anti-apoptotique qui leur est normalement associée à celles-ci et neutraliser la séquestration des formes actives de Bax et Bak. Inversement, dans le modèle direct de l'activation de Bax et Bak, les protéines « BH3-only » peuvent se lier directement à ces molécules et les activer. (D'après Tait et Green, 2010)

conformation fermée. Dans leur conformation ouverte, les pores laissent passer, de manière non sélective, les molécules comme le cytochrome *c* [101]. L'ouverture de ces pores est initiée en réponse à un stress cellulaire tel que les stress oxydatifs causés par les ROS de fortes concentrations en Ca^{2+} , ou la présence d'oxyde nitrique. L'ouverture du mPTP prend part à l'initiation de l'apoptose ou de la nécrose en fonction du contenu cellulaire en ATP [101]. En effet, l'apoptose a lieu en présence d'ATP étant donné que l'activation des caspases est dépendante de la consommation d'ATP. En revanche, la nécrose est souvent une conséquence de la déplétion en ATP, et se caractérise par la rupture de la membrane plasmique et la libération des constituants cellulaires dans le milieu extracellulaire. Cette libération affecte les cellules avoisinantes et favorise l'initiation de la réaction inflammatoire [100,101].

Les résultats obtenus au cours de ce mémoire nous ont mené à nous intéresser à la sous-famille des protéines BH3-only et plus particulièrement à Bnip3 (Bcl-2/adenovirus E1B 19-kDa interacting protein 3). Cette protéine est recrutée à la MME et à la membrane du RE pour induire la mort cellulaire, et est impliquée dans la pathogenèse de plusieurs maladies telles que certains cancers, les maladies cardiovasculaires ou encore l'arthrite rhumatoïde [102,103,104]. Elle est caractérisée par la présence d'un domaine BH3 (domaine 3 d'homologie à Bcl-2) (**Figure 1.19**), d'un domaine transmembranaire en C-terminal et d'un domaine N-terminal orienté vers le cytosol [103,104]. Le domaine transmembranaire et le domaine BH3 sont nécessaires à l'activité pro-apoptotique de la protéine [105]. En effet, en réponse à un stress cellulaire, tel que l'ischémie et l'hypoxie, les protéines Bnip3 forment des homodimères stables au niveau de la MME grâce à l'interaction entre leur domaine transmembranaire [89]. Sous la forme d'homodimères, les protéines Bnip3 induisent la mort cellulaire par les voies apoptotiques ou non-apoptotiques en fonction de la nature du stress et du type cellulaire [105].

1.3.4 Caractérisation de la protéine Bnip3

1.3.4.1 Structure de Bnip3

La protéine Bnip3 a un poids moléculaire de 21,5 kDa, mais sa migration électrophorétique en gel SDS Page (voir point 2.7) est différente puisque cette protéine migre comme un monomère possédant un poids moléculaire de 30 kDa [106]. Le domaine BH3 de Bnip3 permet l'interaction de la protéine avec d'autres membres de la famille Bcl2, tels que Bcl2 et Bcl-XL [105]. Ce domaine possède cependant une faible activité pro-apoptotique comparée à celle d'autres membres de la famille « BH3-only » tels que Bax et Bak [105]. Ceci est peut-être dû au fait qu'il possède une séquence en acides aminés différente. En effet, au lieu de retrouver la séquence hautement conservée L/V/M¹-X²-X³-X⁴-G⁵-D⁶-D/E⁷-F⁸-E⁹-R¹⁰, le domaine BH3 de Bnip3 est caractérisé par la présence d'un résidu Tryptophane à la position 7 [107]. Ce dernier pourrait diminuer l'interaction entre Bnip3 et les autres protéines de la famille Bcl 2 et, de ce fait, réduirait son potentiel pro-apoptotique [105,107]. Toutefois, il a été montré que c'est le domaine transmembranaire de la protéine qui est important pour l'activité pro-apoptotique. En effet, plusieurs études ont montrées qu'une délétion du domaine transmembranaire, tout comme certaines mutations, inhibent l'activité pro-apoptotique de la protéine [103,108]. Le domaine transmembranaire participe à l'activité pro-apoptotique en assurant la localisation et la dimérisation de la protéine en membrane mitochondriale. Il semblerait que la participation de 6 résidus particuliers, à savoir His173, Ser172, Ala176, Gly180, Gly184 et Ile 183, soit nécessaire au rapprochement et à la dimérisation des domaines transmembranaires des protéines Bnip3. En fait, il est pensé que les résidus Ala176, Gly180 et Gly184 participent à la formation de motifs en tandem AxxxG et GxxxG

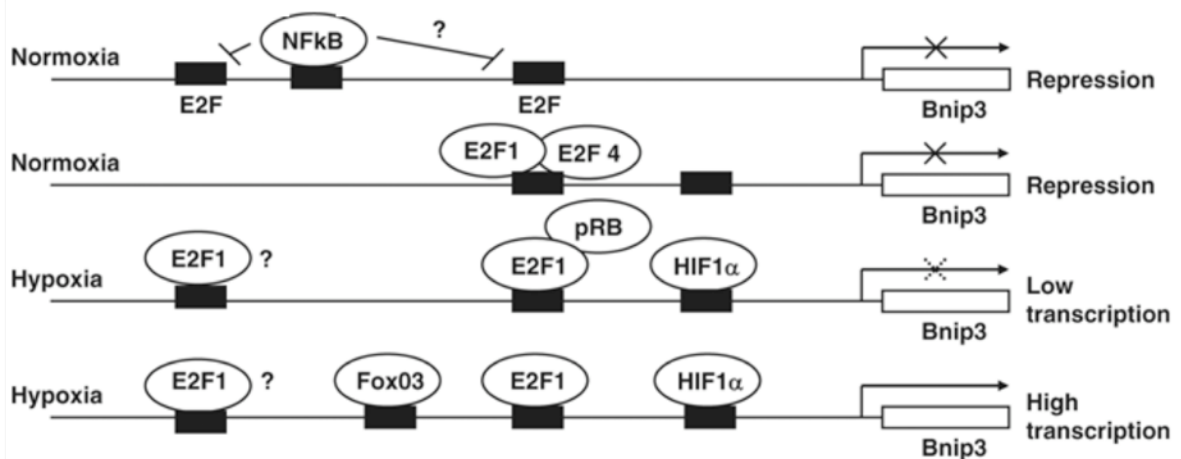


Figure 1.20. Schématisation du promoteur hypothétique de Bnip3 et régulation transcriptionnelle

Il est pensé que la transcription du gène *Bnip3* est réprimée en normoxie par les facteurs de transcription NFκB et E2F4. En hypoxie, l'activité de HIF-1 peut être modérée par une régulation négative dépendante de la protéine du rétinoblastome (pRb) et NFκB, ou est augmentée suite à l'action de E2F1 et/ou FoxO3. (D'après Chinnadurai *et al*, 2008)

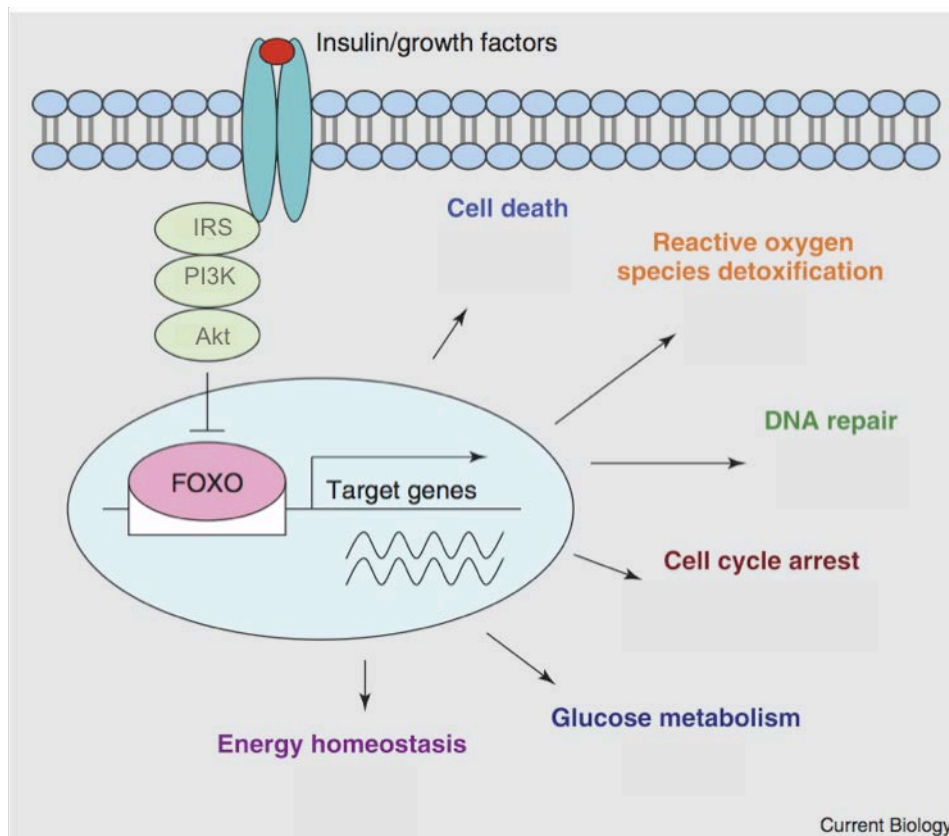


Figure 1.21 La voie de signalisation de l'insuline/PI3K/Akt et inhibition du facteur FOXO

La sous-classe FoxO des facteurs de transcription Fox est régulée par la voie de signalisation de l'insuline/PI3K/Akt. La liaison de l'insuline à son récepteur induit un changement conformationnel de ce dernier, favorisant la trans-autophosphorylation de certains de ses résidus tyrosines. Ceux-ci sont ensuite reconnus par différents récepteurs (Insulin Receptor Substrate, IRS), qui, une fois phosphorylés par le récepteur à l'insuline, seront reconnus par la PI3K (Phosphatidylinositol 3 kinase). Celle-ci phosphoryle et active alors Akt (une serine/threonine Protein Kinase) qui transloquera dans le noyau et phosphorylera ses différents substrats, dont les protéines FoxO. L'activité des facteurs FoxO est inhibée par la phosphorylation dépendante de Akt, car sous forme phosphorylée, le facteur est séquestré dans le cytosol par des protéines de la famille 14-3-3.

Sous forme active, les facteurs de transcriptions FoxO contribuent à l'expression de gènes impliqués dans différents processus cellulaires, tels que la détoxification de ROS, la réparation de l'ADN ou encore la mort cellulaire. (D'après Carter et Brunet, 2007)

nécessaires au rapprochement des hélices des domaines transmembranaires ; que les résidus His173 et Ser172 forment des liaisons hydrogènes entre monomères et assure ainsi la stabilité et la spécificité de l'interaction entre les domaines ; tandis que les Ile183 se lient entre elles par des forces de type Van der Waals [109].

Le domaine N-terminal de Bnip3 contient une séquence PEST, assurant la dégradation de la protéine par la voie du protéasome [105], et un résidu cystéine à la position 64 qui pointe vers le cytosol et agirait comme senseur redox [105]. L'oxydation de ce résidu représenterait une étape clef de l'homodimérisation et de l'activation de la protéine Bnip3 [105]. En effet, lors d'un stress cellulaire tel que l'ischémie, la production de radicaux libres dérivés de l'oxygène pourrait oxyder ce résidu et favoriser la formation de ponts disulfures. Ces ponts disulfures permettraient de stabiliser les protéines de manière covalente et d'ainsi stabiliser l'homodimérisation. Par ailleurs, il a été montré que la substitution de la Cys64 par une Ala diminue fortement l'homo-dimérisation de Bnip3 et son activité pro-apoptotique [108].

1.3.4.2 Régulation de l'expression du gène codant pour Bnip3

Le gène codant pour Bnip3 est localisé sur le chromosome 10q26.3 et son expression est régulée grâce à l'intervention de différents facteurs de transcription (**Figure 1.20**) [105]. Dans un premier temps, il a été mis en évidence que le promoteur de ce gène possède une séquence HRE (Hypoxia Responsible Element) reconnue par le facteur de transcription HIF-1. Les situations de stress hypoxiques (ischémie et zone hypoxique de tumeurs solides) favorisent donc l'expression et l'activation de Bnip3 [105]. Par ailleurs, une étude portant sur la différenciation des ostéoclastes en conditions hypoxiques a mis en évidence l'importance de HIF-1 et Bnip3 dans la régulation de l'ostéoclastogénèse [110]. Ces auteurs montrent que le facteur de transcription HIF-1 stimule l'expression du gène codant Bnip3 afin d'activer l'autophagie, qui est requise pour la différenciation des ostéoclastes.

En plus de HIF-1, le facteur de transcription PLAGL2 (Pleomorphic Adenomas Gene-Like 2) régule également positivement l'expression du gène *Bnip3* en réponse à un stress hypoxique, ou lors d'une déficience en fer [105,111,112]. PLAGL2 possède 7 motifs en doigts de zinc C_2H_2 pouvant se lier à l'ADN [111]. Cependant, le site de liaison de PLAGL2 au promoteur du gène codant Bnip3 n'a pas encore déterminé [105]. Les facteurs de transcription de la famille PLAGL sont associés à l'arrêt de la prolifération cellulaire et à l'induction de l'apoptose. Dans des fibroblastes de souris bald/c3T3, ainsi que dans des neuroblastes de souris (Neuro2a). Il a été montré que PLAGL2 active Bnip3 dans le but d'induire la mort cellulaire par voie intrinsèque [112]. Cette étude a également montré que PLAGL2 agit indépendamment de HIF-1 étant donné qu'il active le promoteur Bnip3 pour lequel les séquences HRE ont été délétées. Néanmoins, il est possible que PLAGL2 et HIF-1 agissent indépendamment mais additionnellement afin d'activer l'expression de Bnip3 en réponse à l'hypoxie [105,111]

Le facteur de transcription FoxO3 (Forkhead box O member 3) est également impliqué dans l'activation du gène Bnip3 lors de l'induction de l'autophagie dans les muscles squelettiques de souris CD1 [113,114]. La famille des facteurs de transcription Fox comprend plus de 100 protéines classées de FoxA à FoxR, et la sous-classe FoxO (composée de FoxO1, 3, 4 et 6) est caractérisée par son mode de régulation par la voie de signalisation de l'insuline/PI3K/Akt (**Figure 1.21**). En général, l'activité des facteurs FoxO est inhibée par une phosphorylation dépendante d'Akt en réponse à une stimulation par l'insuline et aux facteurs de croissance [115]. Les facteurs FoxO sont connus pour réguler l'expression de gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire (comme *p27*, *p130* et *GADD45*), dans la réparation de l'ADN (comme *GADD45* et *DDB1*), dans la réponse à l'hypoxie (dont *CITED2*) et impliquée dans l'apoptose (ex : *FasL*) [115,116]. Il a également été montré dans plusieurs études que FoxO3 contrôle l'activation de l'autophagie en activant l'expression de Bnip3 lors

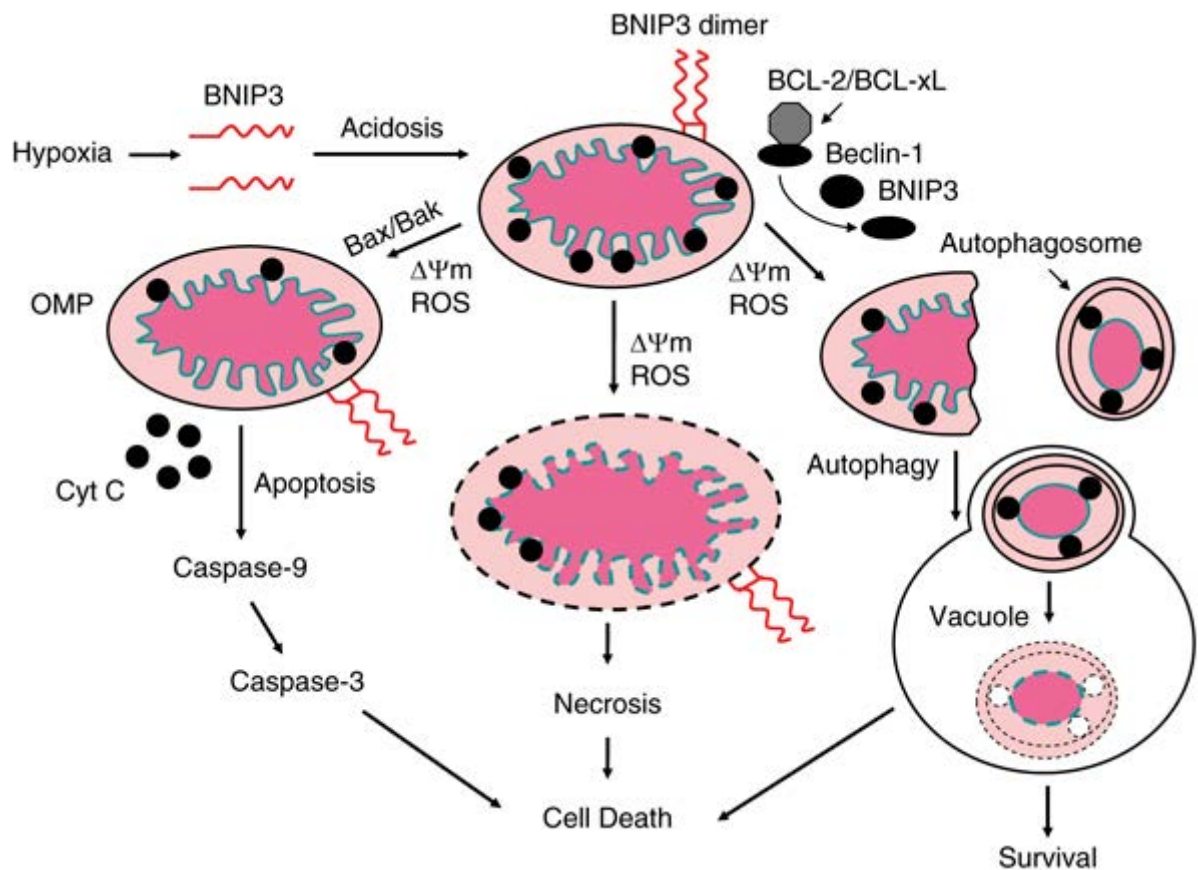


Figure 1.22. Réponses cellulaires activées par Bnip3

En réponse à un stress cellulaire comme l'hypoxie, la protéine Bnip3 (Bcl-2/adenovirus E1B 19-kDa interacting protein 3) sera surexprimée (sous contrôle du facteur de transcription HIF-1) et recrutée en membrane mitochondriale externe (MME). Elle prend alors part, en fonction des conditions, à différents processus cellulaires comme : l'induction de la mort cellulaire (apoptose ou nécrose) ou le maintien de la survie cellulaire. Bnip3 induit l'apoptose en activant les protéines pro-apoptotiques Bax (Bcl-2-associated X protein) et Bak (Bcl-2 homologous antagonist/killer) qui sont impliquées dans l'activation de la voie des caspases. Elle peut également participer à l'initiation de la nécrose en facilitant l'ouverture du pore mPTP (mitochondrial Permeability Transition Pore), induisant ainsi la perte de l'intégrité de la MME et la libération non spécifique de molécules dans le cytosol. Finalement, Bnip3 peut prendre part à l'initiation de la mitophagie, qui peut être impliquée dans la mort cellulaire ou dans la survie cellulaire. (D'après Chinnadurai *et al*, 2008)

de l'atrophie musculaire [113] ainsi que dans les cardiomyocytes en culture réponse à une privation de sérum [114].

L'expression du gène codant pour Bnip3 est également régulée par les facteurs de transcription de la famille E2F. Ces facteurs ont la particularité d'activer des gènes requis pour la prolifération cellulaire et la synthèse de l'ADN [117]. A ce jour, 6 membres ont été caractérisés, avec E2F1 possédant la particularité d'être à la fois impliqué dans la régulation de la prolifération et de la mort cellulaire [117]. Les protéines E2F forment en fait des hétérodimères E2F/DP [118]. Ces sous-unités partagent un site de liaison à l'ADN et se fixent sur le promoteur du gène cible pour initier sa transcription. Sous forme de complexes, les domaines E2F/DP sont associés à un des membres de la famille des protéines du rétinoblastome (pRB, p107 ou p130) et sont alors inactifs. Les complexes E2F-pRB peuvent, entre autres, être dissociés suite à la phosphorylation de la protéine pRB par les kinases dépendantes des cyclines A, E et D [118]. Une étude réalisée sur des cellules fœtales du foie a montré que, en conditions normales, le facteur E2F4 est associé au promoteur du gène codant Bnip3 et réprime son expression. Suite à des dommages de l'ADN, le facteur E2F1 déplace E2F4 afin d'activer la transcription de Bnip3 et induire la mort cellulaire [119]. Cette étude a également montré qu'en conditions hypoxiques, le déplacement de E2F4 par E2F1 est accompagné du recrutement de pRB dans le but de diminuer l'activité du promoteur Bnip3. Ceci aurait pour but de diminuer l'effet positif du facteur de transcription HIF-1 sur l'expression de Bnip3, et de permettre la survie cellulaire en hypoxie [119]. Cet effet pourrait être spécifique du type cellulaire considéré, car sur des cellules du myocarde en conditions hypoxiques, il a été montré que le facteur E2F1 active l'expression de Bnip3 afin d'induire la mort cellulaire par apoptose [117].

Outre l'action de facteurs de transcription régulant positivement l'expression du gène codant pour Bnip3, différents facteurs sont impliqués dans la répression de l'expression de ce gène. Parmi ceux-ci, on retrouve NF- κ B, p53 et pRB [105].

1.3.4.3 Fonctions de la protéine Bnip3

En réponse à un stress cellulaire, le gène codant pour la protéine Bnip3 est surexprimé et la protéine est recrutée en MME. Bnip3 participe alors à l'induction de la mort cellulaire ou, dans certains cas, à la survie cellulaire. Pour ce faire, Bnip3 va soit activer les protéines Bax et Bak, soit induire l'ouverture du pore mPTP afin d'initier, respectivement, la mort cellulaire par apoptose ou par nécrose. Bnip3 peut également activer l'autophagie qui peut être impliquée à la fois dans la survie (en activant la mitophagie des mitochondries non fonctionnelles) ou dans la mort cellulaire (**Figure 1.22**) [102,105,120]. Le rôle de Bnip3 dans la mort et la survie cellulaire reste à ce jour très controversé dans la littérature et semblerait être dépendant du type cellulaire et de la nature du stress rencontré. Il est également important de signaler que la plupart des études réalisées afin d'étudier le rôle de Bnip3 ont été menées en sur-exprimant la protéine, favorisant ainsi sa dimérisation. Cette surexpression peut fausser les résultats obtenus, qui ne seront peut-être pas représentatifs du rôle et de la fonction de la protéine Bnip 3 endogène.

1.3.4.3.1 La mort cellulaire par apoptose et nécrose

Comme expliqué au point 1.3.3.4, le déclenchement de la mort cellulaire par voie apoptotique fait intervenir différentes protéines de la famille Bcl-2, dans le but d'activer la voie des caspases. En réponse à l'activation de Bnip3, les protéines pro-apoptotiques Bax et Bak vont être activées et constituer une étape clef de l'induction de l'apoptose. En effet, une étude réalisée sur des cellules MEFs déficientes en Bax et Bak a montré que ces cellules étaient résistantes à une surexpression de Bnip3 alors que l'expression ectopique de Bax et de Bak dans ces mêmes cellules restaure l'activité pro-apoptotique de Bnip3 [121].

En conditions basales, la protéine pro-apoptotique Bax est inactivée par interaction directe avec Bcl-2, Bcl-XL ou Mcl-1 (myeloid cell leukemia sequence 1) et est localisée dans le cytosol ou faiblement attachée à la MME. La protéine Bak est quant à elle localisée en membrane mitochondriale externe où elle est associée aux protéines anti-apoptotiques Bcl-XL ou Mcl-1, formant ainsi un complexe inactif [122,123]. En réponse à un stress cellulaire, Bax et Bak vont être activées afin d'induire l'apoptose. Bien que ce mécanisme ne soit pas encore bien caractérisé, il semblerait que Bnip3 se lie aux protéines Bcl-2, Bcl-XL et Mcl-1 associées à Bax et Bak dans le but de les libérer (**Figure 1.19**) [106,124]. Une fois l'interaction disruptée, ces protéines changent de conformation et s'assemblent en homo-oligomères pour former des pores dans la membrane mitochondriale externe. Ceux-ci permettent la libération sélective de protéines pro-apoptotiques telles le cytochrome *c* dans le cytosol, afin d'activer la voie des caspases [106,123].

Outre son action sur l'activation de Bax et Bak, Bnip3 pourrait également induire l'apoptose en interagissant avec des protéines impliquées dans la dynamique du réseau mitochondrial. En effet, une étude portant sur l'impact de OPA1 (Optic Atrophy Factor 1) sur la morphologie du réseau mitochondrial de cellules HeLa a montré qu'une fois surexprimée, Bnip3 se lie spécifiquement à Opa1 afin d'induire, dans un premier temps, la fragmentation du réseau mitochondrial mais également dans le but de déstabiliser les crêtes mitochondriales et d'induire l'apoptose [125].

Par ailleurs, il a été montré dans des cellules MCF-7 (cellules tumorales mammaires) que Bnip3 est surexprimé en réponse à l'hypoxie et induit la mort cellulaire par voie nécrotique [126]. Dans ces conditions, une fois stabilisée en membrane mitochondriale, Bnip3 favoriserait l'ouverture du pore mPTP induisant la dépolarisation et la perte de l'intégrité de la membrane mitochondriale externe conduisant, *in fine*, en l'induction de la mort cellulaire par nécrose [102,127].

1.3.4.3.2 L'autophagie

A côté de son rôle dans l'induction de la mort cellulaire et de sa participation au contrôle dans la morphologie de la population mitochondriale, Bnip3 est également impliquée dans l'induction de l'autophagie [105]. En effet, il a été démontré que Bnip3 peut induire la mitophagie afin d'éliminer les mitochondries non-fonctionnelles [105]. D'un point de vue mécanistique, Bnip3 activerait des protéases présentes dans la matrice mitochondriale, dont la m-AAA (m, matrix of mitochondria oriented, homo- or heteromeric complexes containing paraplegin and/or Afg3L1 and Afg3L2 subunits) [128], permettant la dégradation de certaines protéines des complexes I et V de la chaîne respiratoire. Ce processus conduirait à diminuer le potentiel de membrane mitochondriale [129]. Ces mitochondries seraient alors spécifiquement dégradées par mitophagie [102,105,120,129]. Bnip3 participerait également au déclenchement de la mitophagie en facilitant la translocation des protéines DRP1 (Dynamin-Related Protein 1), impliquées dans les phénomènes de fission mitochondriale, et de Parkin [130]. En réponse à une diminution du potentiel de membrane mitochondriale, la protéine kinase PINK1 (PTEN-induced putative kinase 1) est stabilisée en membrane mitochondriale et recrute Parkin qui autorise la mitophagie des mitochondries non fonctionnelles [131]. En interagissant avec DRP1 et Parkin, Bnip3 stimulerait donc la fission mitochondriale et permettrait la dégradation du fragment mitochondrial isolé par mitophagie [102].

En plus de marquer les mitochondries non-fonctionnelles, plusieurs études indiquent que Bnip3 pourrait interagir avec et recruter la protéine LC3, impliquée dans l'initiation de l'autophagie [102,120]. Enfin, Bnip3 peut induire l'autophagie en se liant à Bcl-2 et/ou Bcl-XL normalement associée à Becline afin de libérer la protéine. Celle-ci peut alors participer à l'initiation de l'autophagie (**Figure 1.6**) [132].

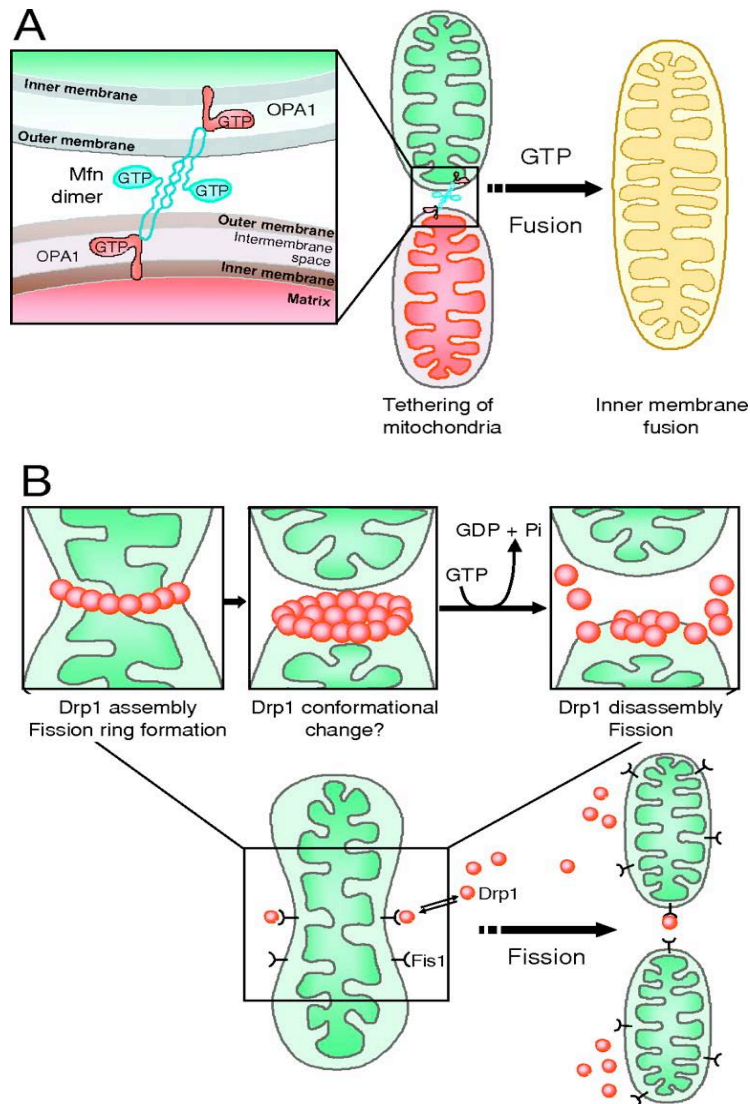


Figure 1.23. Les mécanismes de fusion et fission mitochondriale

A. Les MFN1 et 2 (Mitofusine 1 et 2) sont deux GTPases impliquées dans la fusion des membranes mitochondriales externes. En formant des homo- et hétéro-dimères, les MFN1 et 2 rapprochent deux fragments mitochondriaux l'un de l'autre, induisant ainsi leur fusion. La fusion de la membrane mitochondriale interne est quant à elle médiée par OPA1 (Optic Atrophy Factor 1), également une GTPase. B. La fission mitochondriale est régulée par FIS 1 (Fission 1) et DRP1 (Dynamin-Related Protein 1). La protéine FIS 1 est localisée en membrane mitochondriale externe et recrute DRP1, une GTPase cytosolique qui, une fois recrutée, va oligomériser autour de la mitochondrie pour former un anneau de constriction. (D'après Nisoli et Carruba, 2006)

Les mitochondries sont donc marquées pour l'autophagie indépendamment de l'activation de Bax et Bak et de l'ouverture du pore mPTP. En conditions de stress, l'autophagie médiée par Bnip3 est fortement augmentée et peut participer au maintien de la survie cellulaire en éliminant les mitochondries non-fonctionnelles. Cependant, lorsque le stress cellulaire rencontré est trop important, la dégradation des mitochondries finirait par induire la mort cellulaire. Il reste toutefois beaucoup d'inconnues quant au mode de régulation de l'autophagie lui permettant de passer d'une forme régulatrice du maintien mitochondrial à un état inducteur de mort [120,129].

Pour résumer, Bnip3 est une protéine ubiquiste plus ou moins exprimée en fonction du tissu et de la nature du stress. Elle peut participer aux phénomènes de mort et de survie cellulaires en régulant l'apoptose, la nécrose et l'autophagie. Il a été montré dans différentes études qu'une modulation de l'expression de la protéine est souvent associée à la pathogenèse de maladies [105].

1.3.5 La morphologie mitochondriale

Pour en revenir aux mitochondries, celles-ci sont organisées en un réseau dynamique et peuvent se présenter sous différentes formes, tailles et localisations cellulaires, en fonction du type cellulaire et des conditions physiopathologiques. Des événements fréquents de fusion et de fission sont à la base de la modulation de la morphologie mitochondriale et impliquent la participation de plusieurs protéines cibles (**Figure 1.23**) [133]. La fusion mitochondriale est, entre autres, requise pour le bon fonctionnement de la respiration mitochondriale et la protection (intégrité) de l'ADNmt [65]. La fission est, quant à elle, nécessaire à la ségrégation des mitochondries dans les cellules filles lors de la division cellulaire et permet d'isoler les fragments mitochondriaux non fonctionnels afin de faciliter leur dégradation par mitophagie [65]. La perturbation des mécanismes de fusion et fission est à la base de changements morphologiques et fonctionnels des mitochondries. En effet, une augmentation de la fission mitochondriale est connue pour induire la fragmentation des mitochondries, tandis qu'une augmentation de la fusion favorise l'élongation et l'embranchement des mitochondries. Ces perturbations peuvent causer la production de ROS, altérer la production d'ATP, causer des perturbations dans la régulation de l'homéostasie du calcium et mener à la mort cellulaire dans certaines conditions [43,61,65,134]. Par exemple, les fibroblastes de patients atteints de la MLVI présentent des mitochondries fragmentées dont la capacité à tamponner le calcium est réduite. De plus, ces cellules présentent une sensibilité accrue à l'apoptose comparées aux fibroblastes d'individus sains [43].

1.3.5.1 La fusion mitochondriale

Actuellement, les mitofusines 1 (MFN1) et 2 (MFN2) et OPA1 sont les 3 protéines connues comme étant impliquées dans la fusion mitochondriale dans les cellules de mammifères. Les MFN1 et 2 sont impliquées dans la fusion des MME, tandis qu'OPA1 assure la fusion des MMI. Le gène codant pour la MFN1 est localisé sur le chromosome 3 à la position q26.33, et celui codant pour MFN2 est localisé sur le chromosome 1 à l'emplacement p36.22 [135]. Les MFN 1 et 2 appartiennent à la grande famille des GTPases et partagent 63 % d'identité [135]. Elles sont localisées dans la MME, mais MFN2 est également retrouvée dans la membrane du RE. Les interactions entre MFN2 (interactions dimériques interorganites) assurent l'interaction et le rapprochement physique entre le RE et les mitochondries [136]. Le domaine C-terminal de ces protéines est caractérisé par la présence d'un domaine transmembranaire et d'un domaine HR2 (coiled-coil domain 2), tandis que le domaine N-terminal pointe vers le cytosol et possède un site de liaison au GTP, ainsi qu'un site HR1 [137]. Afin d'assurer la fusion des MME, les MFNs vont former des homo/hétéro-

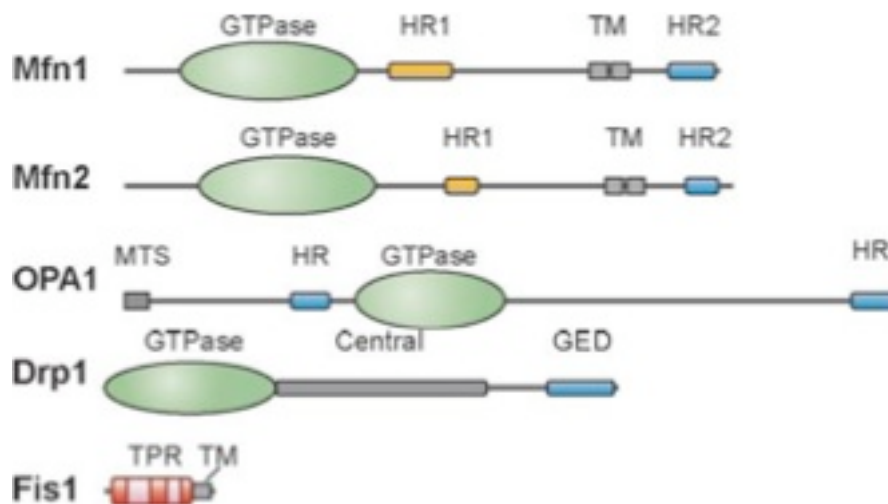


Figure 1.24. Représentation des domaines protéiques des MFN1 et 2, OPA1, DRP1 et FIS1

Les MFN1 et 2 (Mitofusine 1 et 2) possèdent un domaine transmembranaire (TM) et un domaine HR2 (Coiled-coil domain 2) dans leur domaine C-terminal. La partie N-terminale possède un site de liaison au GTP ainsi qu'un site HR1[9].

La région N-terminale d'OPA1 (Optic Atrophy Factor 1) présente un domaine d'adressage mitochondrial (MTS : Mitochondrial Targeting Sequence) ainsi qu'un domaine HR et également un domaine GTPasique. La partie C-terminale possède un deuxième domaine HR. DRP1 (Dynamin-Related Protein 1) possède 3 domaines distincts, à savoir un domaine GTPasique, un domaine central et un domaine d'assemblage (GTPase Effector Domain, GED).

Finalement, FIS1 (Fission 1) possède un domaine transmembranaire en hélice α dans sa partie C-terminale et des séquences TRP1 et 2 (tetratricopeptide repeat peptides) dans sa partie N-terminale qui sont nécessaires à l'interaction entre FIS1 et DRP1. (D'après Chan, 2006)

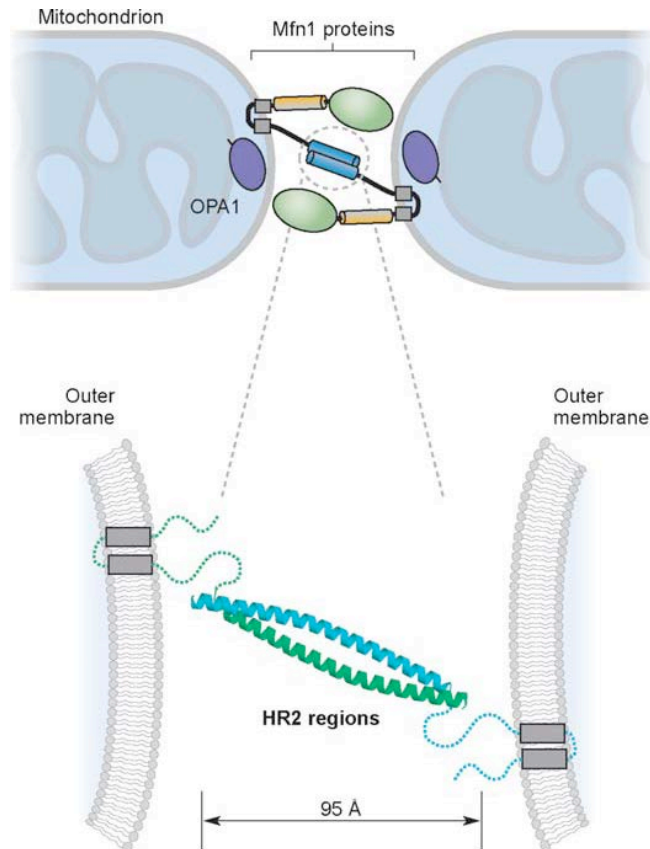


Figure 1.25 Représentation de la dimérisation des Mitofusines

Afin d'assurer la fusion des MME, les MFNs vont former des homo- ou hétéro-dimères grâce à l'interaction de leur domaine HR2 (D'après Chan, 2006)

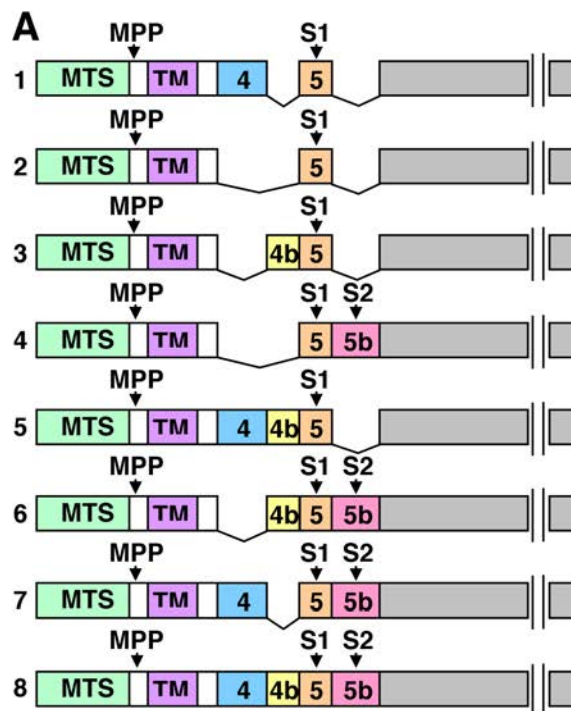


Figure 1.26 Variants de splicing alternatifs de la protéine OPA1

(D'après Song *et al*, 2007)

dimères grâce à l'interaction de leur domaine HR2 (**Figure 1.25**) [138]. Cette étape a pour but de rapprocher deux mitochondries l'une de l'autre. La fusion est ensuite assurée par l'hydrolyse du GTP par un mécanisme qui reste encore peu caractérisé [139].

Bien qu'ubiquistes, l'abondance des MFN1 et 2 varie en fonction des tissus. Ainsi, la MFN1 est fortement exprimée dans le cœur, tandis que la MFN2 est majoritairement retrouvée au niveau du cerveau [140] et dans le muscle strié squelettique [137]. Le ratio MFN1/MFN2 et donc la proportion d'homo- et d'hétéro-dimères (MFN1/MFN1, MFN2/MFN2 et MFN1/MFN2, respectivement) influencera donc aussi la capacité de fusion des mitochondries dans les différents tissus. En effet, une étude réalisée par Ishihara et son équipe a montré que la MFN1 possède une meilleure activité GTPasique que la MFN2, tout en présentant une plus faible affinité pour le GTP [141]. Par conséquent, les cellules exprimant majoritairement la MFN1 possèdent une meilleure capacité de fusion [141].

L'activité des MFNs est fortement régulée. Par exemple, la MFN1 peut être inhibée par une interaction directe avec la protéine MiB (Mitofusin Binding Protein). Cette protéine contient un motif GGVG dans son domaine conservé CBD (coenzyme-binding domain) et celui-ci est essentiel à l'interaction MiB-MFN1. En effet, une mutation de ce motif empêche toute interaction entre les deux protéines. On pense également que MiB inhibe l'activité de la MFN1 en se liant à son domaine GTP [142]. Par ailleurs, il a été mis en évidence que la MFN2 interagit avec plusieurs protéines dont l'ubiquitine ligase MARCH-V (mitochondrial ubiquitin ligase membrane-associated ring V), STOML2 (stomatin-like protein 2), Bcl-XL, Bcl-2 et Bax [143,144,145]. Ainsi, l'interaction de MARCH-V avec MFN2 augmenterait l'activité de la GTPase. Bien que Bax et Bak soient normalement associées à l'initiation de l'apoptose, elles sont également impliquées dans la régulation de la fusion mitochondriale dans les cellules saines. En effet, il a été mis en évidence que les formes solubles de Bax se lient spécifiquement aux complexes MFN2/MFN2 et stimulent la fusion mitochondriale probablement en modulant la conformation des homodimères [143]. Les MFNs sont également connues pour interagir avec OPA1, la protéine impliquée dans la fusion des membranes internes [145].

La protéine OPA1 est encodée par le gène *opa1* qui est localisé sur la région q28-q29 du chromosome 3 [146]. La transcription de ce gène génère 8 isoformes d'ARNm et ce, par un mécanisme de splicing alternatif des exons 4, 4b et 5b (**Figure 1.26**) [147,148]. La région N-terminale de la protéine est caractérisée par la présence d'un domaine d'adressage mitochondrial MTS (Mitochondrial Targeting Sequence) qui est suivi d'un domaine HR impliqué dans la dimérisation des protéines, du domaine GTPasique et de la portion C-terminale présentant un deuxième domaine HR [149]. L'abondance et l'activité de la protéine sont régulées par protéolyse suite à son clivage à deux sites protéolytiques spécifiques (S1 et S2). OPA est exprimée de manière ubiquiste, néanmoins, elle sera plus abondante dans le cerveau, la rétine, le cœur, le foie, les muscles squelettiques et le pancréas [149].

1.3.5.2 La fission mitochondriale

La fission mitochondriale est principalement régulée par l'interaction des protéines FIS1 (Fission 1) et DRP1 (Dynamin-Related Protein 1). Le gène codant pour FIS1 est situé sur le chromosome 7 à l'emplacement q22.1 [150], et celui pour DRP1 sur le chromosome 2 à l'emplacement p11.21 [151]. FIS1 est une protéine résidente et localisée en MME et recrute la GTPase cytosolique DRP1 à la surface mitochondriale. FIS1 est une petite protéine de 17 kDa possédant un domaine transmembranaire en hélice α dans son domaine C-terminal et des séquences TRP1 et 2 (tetra-trico-peptide repeat peptides 1 et 2) dans son domaine N-terminal, qui sont nécessaires à l'interaction FIS1-DRP1 [152]. La simple surexpression de la protéine FIS1 engendre la fragmentation du réseau mitochondrial, tandis que la surexpression de DRP1 n'est pas toujours associée à un changement morphologique des mitochondries [150]. Ces

auteurs proposent donc que FIS1 représente le facteur limitant de la fission mitochondriale [150]. Toutefois, leur rôle dans la fission mitochondriale n'est pas spécifique puisque ces deux protéines assurent également la fission du peroxyosome [153].

Une fois recrutée en MME par FIS1, DRP1 forme des oligomères pour construire un anneau de constriction autour du fragment mitochondrial à isoler (**Figure 1.23**). DRP1 possède 3 domaines distincts, à savoir un domaine GTPasique, un domaine central et un domaine d'assemblage [154]. L'hydrolyse du GTP par le domaine GTPasique fournit l'énergie requise pour la formation de l'anneau de constriction et la fission des mitochondries. Le domaine d'assemblage est nécessaire à l'adressage mitochondrial de la protéine et régule l'activité du domaine GTPasique tandis que le domaine du centre est de fonction inconnue [154,155]. Toutefois, ces 3 domaines sont essentiels à l'activité de DRP1 étant donné qu'une délétion d'un d'entre eux inhibe toute activité mitochondriale de la protéine [154].

Le RE et les mitochondries entretiennent des relations dynamiques et des contacts très étroits et il a été montré récemment que la fission de la mitochondrie se produit aux endroits de contacts entre le RE et la mitochondrie et ce, avant le recrutement de DRP1. Donc les tubules du RE joueraient un rôle actif dans la désignation des endroits de fission mitochondriale [156].

Au vu du changement constant de localisation de DRP1 (cytosol versus mitochondrie), l'activité de cette protéine est fortement régulée. Notons que DDP/TIMM8 α , une protéine présente dans l'espace inter-membranaire qui favorise le recrutement de DRP1 lors de l'apoptose [157]. En fait, dans le cadre de l'apoptose, l'activation des protéines Bax et Bak induit la perméabilisation de la MME et la libération de protéines dans le cytosol dont DDP/TIMM8 α . Celle-ci interagit alors avec la région C-terminale de DRP1 dans le but de faciliter son recrutement en MME et d'activer ainsi la fragmentation mitochondriale [157]. L'ubiquitine ligase MARCH-V favorise également la fission mitochondriale en recrutant DRP1 en MME suite à l'ubiquitination de la protéine [158]. De même, la phosphorylation de DRP1 au niveau de la Ser600 par la CaMKI α (calcium calmodulin-dependent protein kinase I α) facilite la translocation de la protéine en MME [159]. Par contre, la phosphorylation de DRP1 sur la Ser637 par la PKA (cyclicAMP-dependent protein kinase) inhibe l'activité GTPase de la protéine [160]. La sumoylation dépendante de SUMO-1 favoriserait quant à elle la stabilisation de DRP1 en MME [158]. Finalement, la protéine Parkin, une ubiquitine ligase cytosolique de type E3, marque la protéine DRP1 cytosoliques au moyen de l'ubiquitination, ce qui induit sa dégradation par la voie du protéasome en conditions basales [161]. En réponse à une diminution du potentiel de membrane, Parkin est recrutée en MME où elle interagit alors avec PINK1 (PTEN-induced putative kinase 1) dans le but d'induire la fission mitochondriale et la dégradation des mitochondries non fonctionnelles par mitophagie. Il a été montré qu'une déficience en Parkin (notamment dans la maladie de Parkinson) est positivement corrélée à une accumulation de DRP1 et une augmentation de la fragmentation des mitochondries [161]. Une récente étude a également mis en évidence la participation du RE dans la fragmentation mitochondriale [162]. En fait, l'expression de Bnip1, une protéine pro-apoptotique de type « BH3-only » localisée en surface du RE, induit une accumulation de DRP1 et facilite son recrutement en surface mitochondriale. Le domaine BH3 serait essentiel à la participation de Bnip1 dans la translocation de DRP1, étant donné qu'une délétion de celui-ci inhibe le recrutement de DRP1 par Bnip1 [162].

1.3.5.3 Dysfonctionnement des mécanismes de fusion et fission dans les maladies de surcharges lysosomales et les maladies neurodégénératives

Plusieurs données dans la littérature montrent que différentes maladies de surcharges lysosomales et maladies neurodégénératives sont associées à un dysfonctionnement des

mécanismes de fusion et/ou de fission mitochondriales. Comme mentionné au point 1.2.4.4, la MLVI (fragmentation) et la maladie de Batten (élongation) sont deux LSDs pour lesquelles un dysfonctionnement de la dynamique mitochondriale a été mis en évidence [43,61].

Par ailleurs, dans la maladie d'Alzheimer, les neurones affectés par l'accumulation de peptides amyloïdes β ($A\beta$) présentent une diminution de l'expression des protéines MFN1, MFN2 et OPA1, et une surexpression de FIS1 et DRP1 [163]. Ces changements conduisent à une perturbation de la dynamique des mitochondries qui se traduit par une augmentation de la fragmentation de celles-ci [163]. Pour sa part, la maladie de Charcot-Marie de type 2A est une maladie neuro-dégénérative caractérisée par une atrophie musculaire et une perte des fonctions mentales. Cette maladie est associée à des mutations du gène codant pour la MFN2, dont plus de 50 % des mutations sont situées dans le domaine GTPasique de la protéine [164]. Une autre maladie causée par la perturbation de la dynamique mitochondriale est la neuropathie optique dominante autosomale, dont la forme la plus courante est causée par une mutation du gène codant pour OPA1 [165]. Cette pathologie est caractérisée par une perte précoce et progressive de la vision et une mauvaise perception des couleurs. La déficience en OPA1 (déficit de fusion) est à la base de la fragmentation du réseau mitochondrial [165].

En conclusion, la dynamique mitochondriale joue un rôle très important dans la régulation des fonctions mitochondriales et des altérations dans la morphologie (et donc la fonction mitochondriale) qui sous-tendent plusieurs processus pathologiques. Nous pouvons généraliser en disant que, souvent, la fusion mitochondriale favorise la production d'ATP au moyen de la phosphorylation oxydative, tandis que la fission mitochondriale facilite la « mitophagie » et l'élimination des portions de population mitochondriale moins/non fonctionnelles. Ainsi, une perturbation des phénomènes de fusion et de fission pourrait être associée au développement de certaines pathologies telles que des maladies neuro-dégénératives ou des LSDs. Il est donc raisonnable de penser qu'un dérèglement de la dynamique mitochondriale pourrait être associé à la pathogenèse de la LINCL.

1.4 Contexte de la recherche et objectif du mémoire

Les LSDs sont caractérisées par l'accumulation de macromolécules non dégradées au sein des lysosomes. Bien que les causes de cette accumulation et les phénotypes qui y sont associés soient généralement bien caractérisés, les mécanismes moléculaires et voies de signalisation activés en réponse à la surcharge sont encore peu étudiés et peu connus. Toutefois, certaines études ont montré que les fonctions et la morphologie des mitochondries sont affectées dans plusieurs LSDs. Ainsi, dans la maladie de Batten, les mitochondries sont anormalement allongées et ont une capacité réduite à produire de l'ATP [61]. De plus, dans la MLIV, le réseau mitochondrial est fragmenté et les mitochondries ont une capacité réduite à tamponner une augmentation de la concentration en calcium cytosolique libre. Ces modifications sont généralement associées à une sensibilité accrue à l'apoptose [43].

Au vu des différents liens existant entre certaines LSDs et les mitochondries, il est raisonnable de penser qu'une déficience en TPP-1 puisse également affecter les fonctions et la morphologie de cet organelle. C'est l'hypothèse de travail que nous avons testé dans le cadre de ce travail qui fait suite à des données préliminaires obtenues au laboratoire par Stéphane Demine (Mémoire 2010), qui montrent une fragmentation du réseau mitochondrial dans les cellules LINCL.

L'objectif principal de ce travail est donc d'étudier les effets éventuels d'une déficience en TPP-1 sur la population mitochondriale. Pour y parvenir, nous avons voulu :

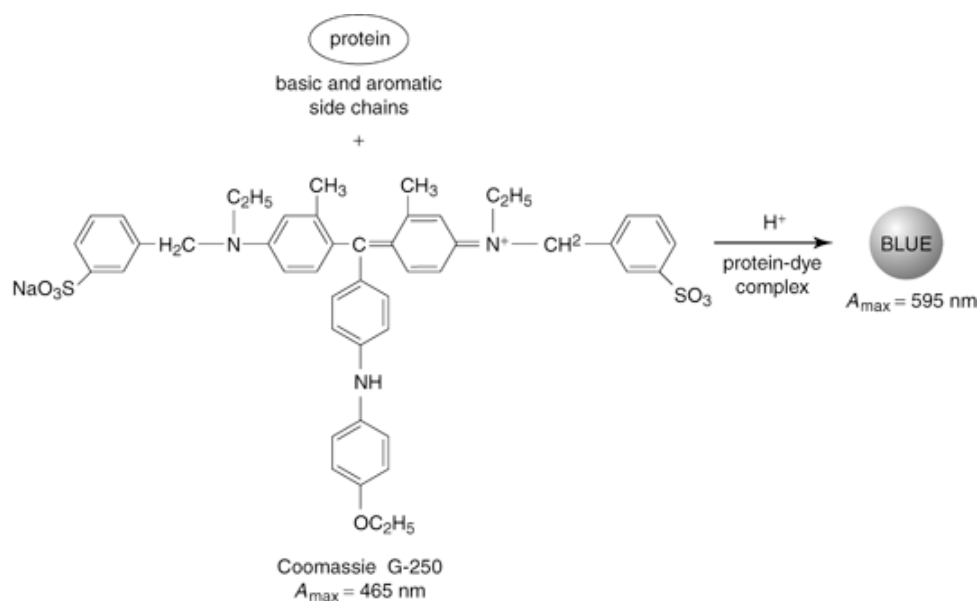
1. confirmer et analyser les changements morphologiques de la population mitochondriale observés dans des cellules présentant une déficience en TPP-1
2. étudier l'impact éventuel d'une déficience en TPP-1 sur plusieurs fonctions des mitochondries
3. rechercher les effets éventuels d'une déficience en TPP-1 sur l'expression de gènes nucléaires codant pour des protéines mitochondriales

Tableau 2.1. Milieu de culture MEM :

Composition	Concentration finale
Minimum Essential Medium (Invitrogen)	1 x
Sérum de veau fœtal (Gibco)	10 %
Pyruvate (Gibco)	1 mM
Acides aminés non essentiels (NEAA) (Gibco)	100 μ M

Tableau 2.2. Composition du PBS :

Composition	Concentration finale
NaCl (Merck, Allemagne)	150 mM
KH ₂ PO ₄	100 mM, pH 7,4
K ₂ HPO ₄	100 mM

**Figure 2.1. Dosage de protéines par la méthode de Bradford ou à l'aide du réactif de Pierce.**

La technique de dosage au Bradford permet de quantifier l'abondance de protéines présentes dans un échantillon. Il s'agit d'une méthode colorimétrique basée sur le changement de coloration du bleu de Coomassie suite à sa liaison aux acides aminés basiques et aromatiques. En présence de protéines, le bleu de Coomassie passe d'une couleur brunâtre à bleue, et ce proportionnellement à la quantité de protéines présentes dans l'échantillon. La liaison des protéines au colorant est possible grâce à l'environnement acide du réactif. De même, cette liaison protéine-bleu de Coomassie entraîne une modification de l'absorbance maximale du réactif, passant de 465 nm à 595 nm.

Le dosage protéique avec le réactif de Pierce repose sur la liaison d'un colorant métallique aux protéines et se réalise en conditions acides. Le faible pH induit la déprotonation du colorant métallique, qui se fixe alors aux acides aminés chargés positivement (histidine, arginine et lysine principalement). La déprotonation induit une modification du pic d'absorption du colorant, qui est alors mesuré à 660 nm. Suite à la liaison protéine-réactif, ce dernier passe d'une coloration brune à une coloration verte qui sera stable dans le temps et dont l'intensité sera directement proportionnelle à la quantité de protéines présentes.

(D'après Krohn, 2005).

2 Matériel et méthodes

2.1 Culture cellulaire :

2.1.1 Lignées cellulaires utilisées

Au cours de ce mémoire, deux lignées de fibroblastes de peau humains ont été utilisées (Coriell Institute, USA). La première lignée a été isolée à partir d'un patient sain de 30 ans et d'origine caucasienne (GM02456). Elle est utilisée comme lignée de cellules contrôles et est référée dans ce travail sous l'appellation de « fibroblastes CTL ». La deuxième lignée cellulaire utilisée provient d'une jeune patiente asiatique souffrant de la Lipofuscinose Céroïde Neuronale Infantile Tardive (LINCL) (GM09404). Ces fibroblastes présentent une déficience pour l'enzyme TPP-1 qui résulte d'une mutation faux-sens dans l'exon 7 du gène *cln2* (qui en comporte 13 [166]) où la thymidine présente à la position 4023 est substituée par une adénosine. Le codon isoleucine-287 (ATC) est ainsi remplacé par celui d'une asparagine (AAC). Cette lignée cellulaire est référencée dans ce travail sous le nom de « fibroblastes LINCL ». Etant donné qu'aucune de ces deux lignées n'ait été immortalisée, les cellules vieillissent lors des passages successifs en culture. Chaque passage au moment d'un repiquage à une dilution 1/2 (en surface), correspond à l'ajout d'une nouvelle génération. Celles-ci sont soigneusement comptées afin de prendre en considération le vieillissement cellulaire. Dans le cas des fibroblastes, un maximum de 30 passages a été accepté.

2.1.2 Culture cellulaire

Les fibroblastes sont cultivés dans des boîtes de culture cellulaire de 75 cm² (T-75) (Greiner Bio-One Cellstar, Allemagne) dans 20 ml de milieu de culture MEM (Minimum Essential Medium, Invitrogen) complété de 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) riche en facteurs de croissance, de 1 mM de pyruvate (Gibco) ainsi que de 100 µM d'acide aminés non essentiels (Gibco). Ce milieu est référé dans ce mémoire sous l'appellation de « milieu MEM complet » (**Tableau 2.1**). Les fibroblastes étant des cellules adhérentes, ceux-ci se fixent au fond de la boîte de culture (substrat) et forment un tapis cellulaire résultant de leur prolifération. Une fois arrivés à confluence, les fibroblastes sont rincés avec 10 ml de PBS (**Tableau 2.2**) préchauffé à 37 °C puis détachés avec 2 ml de trypsine 0,25 % + 200 µg/ml d'EDTA (Ethylen Diamine Tetra-acetic Acid) pendant 3 min. L'activité de la trypsine est ensuite neutralisée par l'addition de 10 ml de milieu MEM complet et les cellules sont comptées en utilisant la chambre de comptage de Neubauer (Marienfeld, Allemagne). Les cellules sont finalement réparties à une dilution de 1/3 dans des boîtes de culture dont le format est fonction des expériences à réaliser ultérieurement. Les cellules incubent à 37 °C dans une étuve à atmosphère humide contenant 5 % de CO₂.

2.2 Dosage protéique avec les réactifs de Pierce et Bradford :

2.2.1 Principe

Le dosage de la concentration en protéines est réalisé après chaque extraction protéique quel que soit le type de préparation des échantillons (les méthodes d'extractions sont décrites dans les différents paragraphes relatifs aux différentes expériences réalisées). Les techniques de dosage de Bradford et Pierce sont des méthodes colorimétriques utilisées dans le but de quantifier la concentration des protéines présentes dans un échantillon (**Figure 2.1**). Une courbe d'étalonnage réalisée à partir de concentrations connues en albumine de sérum bovin (ASB) est également réalisée pour permettre la conversion des valeurs d'absorbance en concentrations protéiques.

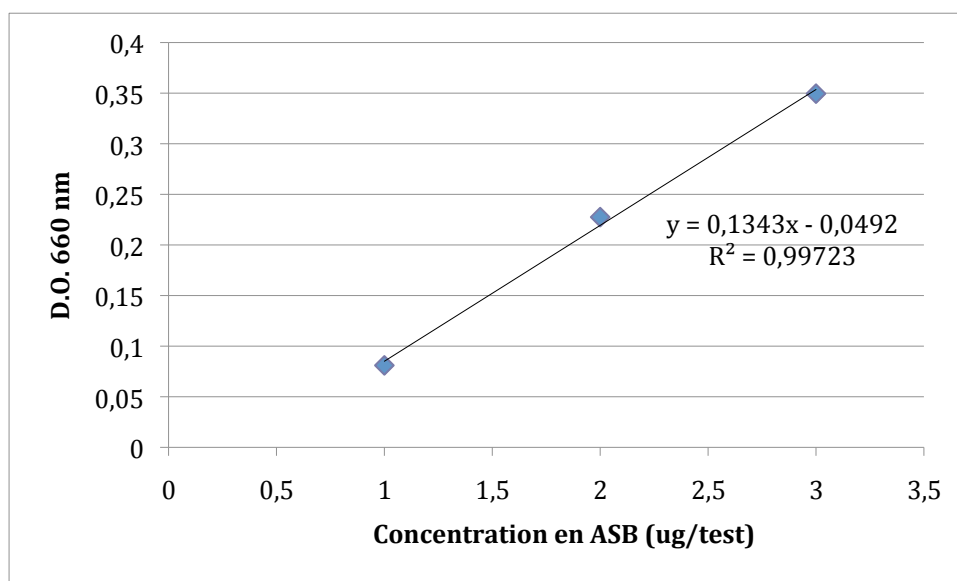


Figure 2.2. Exemple d'une droite d'étalonnage à l'ASB :

Des quantités de 1, 2 et 3 µg d'ABS sont diluées dans de l'eau distillée (volume final de 10 µl) et déposées dans les puits d'une plaque 96 puits. Un volume de 150 µl de réactif de Pierce (dans ce cas-ci) est ajouté et la solution incube pendant 5 minutes à température ambiante. Ensuite, la lecture de l'absorbance est ensuite mesurée au spectrophotomètre à 660 nm, et les résultats sont exprimés sous la forme d'un graphique reprenant les valeurs de D.O. à 6660 nm en fonction de la concentration en protéines. Une droite de régression est finalement dessinée.

2.2.2 Protocole

Lors du dosage protéique selon la méthode de Bradford, 1 ml de solution de Bradford diluée 5 x dans de l'eau distillée (MilliQ), et 2 µl d'échantillon sont incubés pendant 5 min (selon la nomenclature internationale) au minimum à température ambiante avant que l'absorbance (densité optique/D.O.) ne soit déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre à 595 nm. Le temps d'incubation de chaque échantillon en présence de la solution de Bradford doit être précis étant donné que les complexes protéines-réactifs ont tendance à s'agglomérer au cours du temps, diminuant l'intensité de la coloration [167]. Une droite d'étalonnage reprenant des concentrations croissantes en albumine sérique bovine (ASB) (1 µg, 2 µg et 3 µg/10 µl) est réalisée (**Figure 2.2**), ainsi qu'un blanc étalon (MilliQ) et un blanc échantillon (tampon de lyse). La concentration en protéines des différents échantillons est ensuite calculée à partir de la courbe de calibration suivant la formule :

$$C_{\text{éch.}} (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \frac{(\text{Abs}_{\text{éch.}} - \text{Abs}_{\text{blanc éch.}})}{(\text{Abs}_{\text{étalon}} - \text{Abs}_{\text{blanc étalon}}) \times (V_{\text{étalon}} \times C_{\text{étalon}} / V_{\text{éch.}})}$$

Le dosage protéique selon la méthode de Pierce se réalise dans un format de plaques à 96 puits (Greiner Bio-One 655101). Les échantillons sont dilués 5 x dans de l'eau (MilliQ) (volume final 10 µl) et déposés en duplicats dans les puits de la plaque. Des quantités croissantes d'ASB (1 µg, 2 µg et 3 µg dans un volume final de 10 µl) sont également ajoutées pour réaliser la droite d'étalonnage, ainsi qu'un blanc à l'eau distillée (MilliQ) et un blanc avec le tampon de lyse utilisé. Un volume de 150 µl de réactif de Pierce est alors ajouté avant une incubation de 5 min à température ambiante pour permettre la réaction. Finalement, l'absorbance (D.O.) de la solution est déterminée au spectrophotomètre à 660 nm.

2.3 Restauration de l'activité enzymatique TPP-1 des fibroblastes LINCL :

2.3.1 Principe

La restauration de l'activité enzymatique de la TPP-1 dans les fibroblastes LINCL nécessite l'utilisation d'une pro-enzyme TPP-1 recombinante produite par des cellules CHO (Chinese Hamster Ovary Cell) selon un protocole établi par Lin et son équipe [168]. Les avantages que procure cette technique sont les suivants : premièrement, les cellules CHO étant des cellules eucaryotes, l'enzyme produite peut acquérir les modifications post-traductionnelles nécessaires à son activité et à son adressage lysosomal. Deuxièmement, la pro-enzyme est ajoutée au milieu de culture à une concentration de 3 nM, et est directement délivrée aux lysosomes des fibroblastes LINCL par endocytose constitutive médiée par des récepteurs à mannose-6-phosphate.

2.3.2 Protocole

Les fibroblastes LINCL confluents sont repiqués dans des boîtes ou plaques de culture à 30 % de confluence. Le lendemain, les cellules sont rincées 1 fois dans du PBS préchauffé à 37 °C, puis incubées pendant 48 h en présence de la pro-enzyme TPP-1 recombinante (3 nM) diluée dans du milieu MEM complet. Le milieu de culture est ensuite remplacé par du milieu MEM complet frais ne contenant pas de pro-enzyme recombinante, et les cellules sont maintenues en culture pendant 5 jours avant la réalisation des différentes expériences.

Tableau 2.3. Composition de la mixture réactionnelle :

Composition	Concentration finale
Acétate de sodium (Merck, Allemagne)	100 mM ; pH 4
NaCl (Merck, Allemagne)	150 mM
Triton X-100 (Acros Organics, Pays-Bas)	0,1 %
Ala-Ala-Ala-Phe-AMC	1 mM

Tableau 2.4. Composition du tampon glycine/EDTA :

Composition	Concentration finale
Glycine (Merck, Allemagne)	50 mM ; pH 10,5
EDTA (Merck, Allemagne)	5 mM
Triton X-100	0,05 %

2.4 Dosage de l'activité enzymatique de la TPP-1 :

2.4.1 Principe

Il a été mis en évidence que l'Ala-Ala-Ala-Phe-7-amido-4-méthylcoumarine (Ala-Ala-Ala-Phe-AMC) constitue un substrat spécifique de la TPP-1 et l'analyse des produits de son clivage protéolytique par l'enzyme peut être utilisée afin de doser l'activité de cette enzyme [169]. En effet, suite à l'action de la TPP-1, le groupement AMC est libéré et émet un signal de fluorescence (λ Ex : 350 nm ; λ Em : 460 nm) dont l'intensité est proportionnelle à l'activité de la TPP-1 qui peut donc être quantifiée à l'aide d'un spectrofluorimètre.

2.4.2 Protocole

Le dosage de l'activité enzymatique est réalisé au départ de fibroblastes CTL, de cellules LINCL et de cellules LINCL complémentées en TPP-1 préalablement ensemencées dans des boîtes de culture de 75 cm² (Greiner Bio-One Cellstar, Allemagne) et ayant atteint la confluence. Les cellules sont rincées à 2 reprises avec 10 ml d'une solution de saccharose à 0,25 M diluée dans de l'eau distillée (MilliQ) (4°C), et sont ensuite récoltées dans 1 ml de saccharose 0,25 M. Les cellules sont ensuite homogénéisées par 5 passages à l'homogénéisateur de Dounce. Les homogénats sont transférés dans des microtubes (Saerstedt, Allemagne) et sont conservés à 4 °C jusqu'au dosage. Un volume de 180 µl de mixture réactionnelle (**Tableau 2.3**) est alors placé dans une cuvette de spectrofluorimètre et la mixture est préchauffée dans un bain à 37 °C. On ajoute ensuite 20 µl de lysat cellulaire (ou 20 µl de saccharose 0,25M pour le blanc échantillon) et la réaction enzymatique est incubée pendant 60 min avant d'être stoppée par l'addition de 1,2 ml de tampon glycine/EDTA (**Tableau 2.4**). La fluorescence de la mixture réactionnelle résultant du clivage du substrat, est mesurée au spectrofluorimètre (SPF-500C, SimAmingo, SLM Instruments, UK) (λ Ex : 350 nm ; λ Em : 460 nm). Les résultats sont exprimés en unités arbitraires de fluorescence (UAF) normalisées par la quantité de protéines après réalisation d'un dosage protéique selon la méthode de Bradford (AUF/µg de protéines) (voir point 2.2).

2.5 Quantification de l'abondance du réseau mitochondrial (Mitotracker Green)

La quantification de l'abondance du réseau mitochondrial a été réalisée en cytométrie de flux. Cette technique permet d'analyser des particules en suspension (telles que des cellules) pour plusieurs paramètres simultanément (la taille, la granulosité). L'intensité de fluorescence correspond à un ou plusieurs marquages. Cette technique offre l'avantage d'apporter des informations concernant des sous-populations cellulaires. Pour ce faire, les cellules sont excitées une à une à l'aide d'un faisceau laser de longueur d'onde définie. Ce faisceau va être diffracté, réfracté et réfléchi par la cellule, ce qui apporte une information physique sur celle-ci. Ce faisceau permet également d'exciter un fluorochrome couplé à un anticorps ou une sonde fluorescente, utilisé(e) afin de marquer les cellules.

L'abondance mitochondriale a été analysée sur des cellules dont les mitochondries ont été marquées au moyen de la sonde MitoTracker Green à 100 nM. Cette sonde s'accumule spécifiquement dans la mitochondrie et possède un groupement chlorométhyl pouvant réagir avec les groupements thiols présents sur les résidus cystéines des protéines mitochondriales. Par ailleurs, l'accumulation de cette sonde au sein des mitochondries est indépendante du potentiel de membrane mitochondriale [170] (Molecular probes, USA).

Les fibroblastes CTL et LINCL ont été repiqués dans des boîtes de culture à 6 puits (Costar) à une densité de 40 000 cellules/puits. Dans les cellules LINCL + TPP-1, les cellules LINCL ont été préalablement incubées en présence de la pro-enzyme recombinante. Après 7 jours, les cellules ont été rincées avec 2 ml de PBS, puis détachées par un traitement de 5 min avec 1 ml de trypsine + EDTA (200 µg/ml). Elles sont ensuite resuspendues dans 2 ml de

Tableau 2.5. Composition du tampon Kreb's Ringer Buffer :

Composition	Concentration finale
NaCl (Merck, Allemagne)	125 mM
KCl (Merck, Allemagne)	5 mM
CaCl ₂ (Merck, Allemagne)	1,3 mM
MgSO ₄ (Merck, Allemagne)	1,2 mM
HEPES (Acros Organics, Pays-Bas)	25 mM ; pH 7,4

milieu MEM complet avant d'être centrifugées pendant 10 min à 1000 rpm (température ambiante). Les cellules sont alors resuspendues dans 2 ml de tampon Kreb's Ringer Buffer (KRH) (**Tableau 2.5**), et sont à nouveau centrifugées à 1000 rpm. Ensuite, les cellules sont resuspendues dans 2 ml de KRH contenant 0,5 % d'ASB et la sonde MitoTracker Green à 100 nM. Au terme d'une incubation de 30 min sur agitateur à 37 °C et à l'obscurité, une dernière centrifugation de 5 min à 1000 rpm et à 4 °C est réalisée pour sédimenter les cellules. Pour le passage au cytomètre de flux (BD Biosciences, USA), les cellules sont resuspendues sur glace dans 2 ml de KRH + ASB à 0,5% et transférées dans des tubes spéciaux. Des blancs échantillons (sans sonde) sont également réalisés afin de déterminer l'autofluorescence des cellules.

Paramètres : canal FL2 (λ ex. : 436 nm, λ ém.: 637 nm).

2.6 Analyse de la morphologie du réseau mitochondrial :

La morphologie du réseau mitochondrial est visualisée en microscopie confocale sur des cellules marquées à l'aide de la sonde fluorescente Mitotracker Green (Molecular Probes) (voir point 2.5). Les cellules CTL et LINCL sont cultivées dans des chambres de culture Lab-Tek II (VWR, France) (permettant la visualisation de cellules vivantes) à une densité de 10 000 cellules par chambre. Le lendemain, les cellules sont rincées avec 1 ml de tampon KRH (Tableau 2.5) par chambre. Les cellules sont ensuite incubées à l'obscurité et à 37°C en présence de Mitotracker Green à 100 nM diluée dans du KRH contenant de l'ASB à 2 % pendant 30 min. Les cellules sont alors rincées avec du KRH + ASB à 2 %, et la morphologie du réseau mitochondrial est observée en microscopie confocale (λ exc : 490 nm et λ ém : 516 nm). Un contrôle positif est également réalisé en pré-incubant les cellules CTL pendant 30 min en présence de l'agent découplant FCCP (p-triFluoromethoxy Carbonyl Cyanide Phenylhydrazine) à 20 μ M, une molécule bien décrite pour induire la fragmentation du réseau mitochondrial [133]. La fragmentation du réseau mitochondrial est ensuite quantifiée en utilisant le programme ImageJ selon la méthode établie par De Vos et Sheetz [171]. Dans un premier temps, ce programme permet de déterminer l'Aspect Ratio du réseau mitochondrial. Celui-ci est calculé à partir du ratio entre les longueurs longitudinales (*l_{major}*) et axiales (*l_{minor}*) de chaque fragment du réseau mitochondrial. Si le réseau est fragmenté, la moyenne des AR sera petite. Afin de maximiser le signal, les images ont premièrement été converties en images de taille 8 bits puis traitées au moyen de l'outil brightness/contrast du logiciel ImageJ. Après cette étape, les images ont été filtrées à l'aide du filtre kernel 7x7 hat. Les longueurs longitudinales et axiales de chaque fragment ont ensuite été déterminées à partir de la fonction « analyse des particules » du logiciel, et l'AR a finalement été calculé. Deuxièmement, le logiciel permet de calculer de ratio end points (EP)/branch points (BP). Si le réseau est fragmenté, le nombre de EP augmente tandis que celui des BP diminue. Pour mesurer le ratio EP/BP, les mitochondries ont premièrement été squelettisées, et le nombre de EP et BP a finalement été déterminé au moyen de l'outil BinaryConnectivity du logiciel [171].

2.7 Anayse de l'abondance protéique par Western Blot en fluorescence ou en chémiluminescence :

Le Western Blot est une technique permettant de séparer par électrophorèse, d'identifier et de (semi)-quantifier l'abondance d'une protéine d'intérêt au sein d'un échantillon donné. La détection de la protéine cible se réalise préférentiellement en fluorescence, cette méthode ayant l'avantage d'être plus quantitative et ce, sur une large gamme dynamique [172]. Toutefois, ce mode de détection n'est pas assez sensible pour révéler des protéines très peu abondantes telles que HIF-1 α [173,174]. Dans ce cas, la chémiluminescence est utilisée.

Tableau 2.6. Composition du tampon de lyse DLA :

Composition	Concentration finale
Urée (GE Healthcare, USA)	7 M ; pH 8,5
Thiourée (GE Healthcare, USA)	2 M
Chaps	4 %
Tris-HCl (Merck, Allemagne)	30 mM
PIC (Roche Molecular Biochemicals, Allemagne)	4 %
PIB (tableau 2.6)	4%

Tableau 2.7. Composition du PIB :

Composition	Concentration finale
Na ₃ VO ₄ (sigma, USA)	25 mM
NaF (Merck, Allemagne)	125 mM
Nitrophenylphosphate (Sigma, USA)	250 mM
β-glycerophosphate (Sigma, USA)	250 mM

Tableau 2.8. Composition du tampon échantillon :

Composition	Concentration finale
Tris-HCl (Merck, Allemagne)	1 M ; pH 6,8
SDS (MP Biomedicals, France)	20 %
Glycerol (Merck, Allemagne)	20 %
β-mercaptoéthanol (Flukachemi AG, Suisse)	4 %
Bleu de bromophénol (Janssens Chemica, Belgique)	1%

Tableau 2.9. Composition du tampon de lyse :

Composition	Concentration finale
Tris-HCl (Merck, Allemagne)	80 mM ; pH 7,5
KCl (Merck, Allemagne)	300 mM
EDTA (Merck, Allemagne)	2 mM
Triton X-100 (Merck, Allemagne)	1 %
PIC (Roche Molecular Biochemicals, Allemagne)	10 %
PIB (tableau 2.6)	10

Tableau 2.10. Gels NuPage:**Gels 4-12 % Bis-Tris (Invitrogen, USA)/ 3-8 % Tris-Acetate**

Tampon échantillon	- 200 µl LDS Sample Buffer 4 x (NP0007, Invitrogen, USA) - 10 µl DTT 1 M (Sigma, USA)
Tampon de migration	- Solution 1 : 50 ml NuPage MOPS SDS Running Buffer 20 x (Invitrogen, USA) + 950 µl H ₂ O (MilliQ)/ Solution 1 : 50 ml NuPage Tris-Acetate SDS Running Buffer 20 x (Invitrogen, USA) + 950 µl H ₂ O (MilliQ) - Solution 2 : 200 ml Solution 1 + 500 µl NuPage Antioxydant (NP0005, Invitrogen, USA)
Tampon de transfert	- 10 ml NuPage SDS Transfert Buffer 20 x (NP0006, Invitrogen, USA) - 40 ml méthanol (ACROS organics, USA) - 200 µl NuPage Antioxydant (NP0005, Invitrogen, USA) - 149,8 ml H ₂ O (MilliQ)
Migration	200 V, 400 mA

Tableau 2.11. Composition du gel séparateur :

composition	Concentration finale
Tris-HCl (Merck, Allemagne)	1 M ; pH 8,9
SDS (MP Biomedicals, France)	10 %
Acrylamide Ilbis (Bio-Rad, USA)	8 ou 12 %
APS (Amersham Biosciences, UK)	0,1 %
TEMED (Amersham Biosciences, UK)	0,15 %

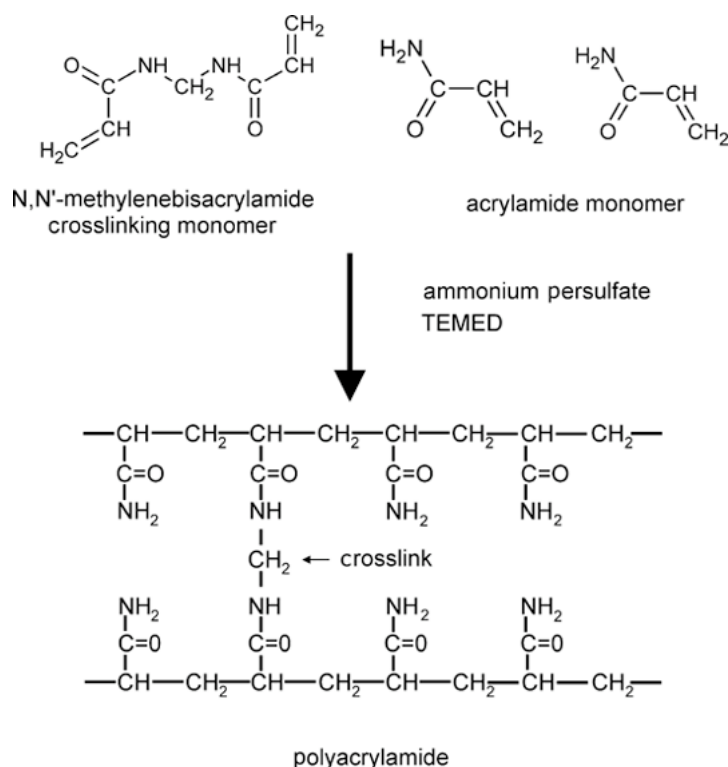


Figure 2.3 : Polymérisation du gel d'électrophorèse.

Les protéines présentes dans l'échantillon sont séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) (conditions dénaturantes). Le SDS présent dans le gel est un détergent anionique fort responsable du recouvrement des protéines de charges négatives. De ce fait, les charges se repoussent favorisant le dépliement des protéines qui migrent alors dans le gel en fonction de leur poids moléculaire. Le réseau de polyacrylamide est formé par la polymérisation de monomères d'acrylamide en présence de bis-acrylamide, de TEMED (tétraméthyl éthylène diamine) et d'APS (persulfate d'ammonium). Le TEMED favorise la formation de radicaux libres $\text{SO}_4^{\cdot(-)}$ à partir d'APS, et ceux-ci vont venir réagir avec les monomères d'acrylamide pour former des complexes pourvus de doublets électroniques libres. Ces derniers peuvent à leur tour réagir avec d'autres monomères d'acrylamide et ainsi permettre la polymérisation du gel. De même, des monomères de bis-acrylamide sont présents dans le gel dans le but de former des ponts entre les différents polymères d'acrylamide. Le gel ainsi polymérisé présente l'aspect d'un tamis moléculaire au travers duquel circuleront les protéines. Ce tamis moléculaire peut être plus ou moins concentré afin de faire circuler des protéines de différents poids moléculaires ; un tamis serré permettant de séparer des protéines de petits poids moléculaires, alors qu'une maille plus lâche permettra la résolution de protéines de haut poids moléculaires.

(D'après Gallagher, 2006).

2.7.1 Préparation des échantillons

2.7.1.1 Préparation de lysats clairs totaux

Les fibroblastes CTL et LINCL arrivés à confluence sont repiqués en boîtes T-75 à une densité de 300 000 cellules/boîte. Les cellules LINCL sont ensuite incubées ou non en présence de l'enzyme TPP-1 suivant le protocole détaillé au point 2.3, les cellules sont rincées une fois avec 10 ml de PBS froid (4 °C) (**Tableau 2.2**) puis sont récoltées dans 10 ml de PBS au moyen d'un «grattoir» (Tissue Culture and Laboratory Technology, Suisse). Les cellules sont alors placées dans des tubes Falcon de 15 ml (Corning, USA) et centrifugées pendant 5 min à 1000 rpm. Le culot de cellules est alors resuspendu dans 50 µl de tampon de lyse DLA (**Tableau 2.6**) contenant un mélange d'inhibiteurs de protéases (PIC : Proteases Inhibitor Cocktail Roche) et de phosphatases (PIB : Phosphatases Inhibitor Cocktail, **tableau 2.7**). Les lysats homogénéisés pendant 20 min dans le thermomixer (Eppendorf, France) à 24°C et 700 rpm. Finalement, les lysats sont centrifugés pendant 10 min à 13 000 rpm, et les surnageants (les lysats clairs) sont aliquotés et conservés à - 70 °C.

Afin de déterminer la concentration protéique des lysats clairs, un dosage de protéines par la méthode de Pierce est réalisé (voir point 2.2). Un volume correspondant à 20 µg de protéines est préparé, auquel on ajoute 20 % de « tampon échantillon » (**Tableau 2.8**) concentré 5 x, ainsi que de l'eau distillée (MilliQ) afin que tous les échantillons aient un volume égal. Le tampon échantillon est composé de glycérol (qui a la particularité d'alourdir les échantillons et d'ainsi faciliter leur chargement dans le gel d'électrophorèse) de β-mercaptoéthanol (permettant la dénaturation des protéines suite à la réduction des ponts disulfures) et de bleu de bromophénol facilitant la visualisation du front de migration des échantillons. Avant d'être chargés, les échantillons sont portés à 100 °C pendant 5 min dans le but de dénaturer les protéines, puis sont centrifugés brièvement. Un étalon de poids moléculaire (LI-COR, Odyssey USA ou SeeBlue pour les gels NuPage, Invitrogen USA) est également chargé dans l'un des puits afin d'estimer le poids moléculaire des bandes obtenues lors de la révélation.

La protéine HIF-1α possède un temps de demi-vie inférieur à 5 min [175] et il est donc difficile de l'extraire avant qu'elle ne soit dégradée. De ce fait, la préparation des échantillons pour l'analyse de ce facteur de transcription diffère de la précédente. Sur glace, les cellules CTL, LINCL et LINCL + TPP-1 sont collectées à l'aide d'un grattoir à cellule dans 200 µl de tampon de lyse (**Tableau 2.9**), et placées dans des microtubes (Sarstedt, Allemagne) avant d'être centrifugées pendant 10 min à 13 000 rpm et à 4 °C. Le surnageant (lysat clair) est alors aliquoté et la concentration protéique des échantillons est dosée par la méthode de Bradford (voir point 2.2). La préparation des échantillons est identique à celle expliquée précédemment, à l'exception que la quantité de protéines à charger est de 60 µg. Par ailleurs, la révélation de la protéine HIF-1α ne se réalise pas en fluorescence mais en chimioluminescence, et l'étalon de poids moléculaire utilisé est le SeeBlue (Invitrogen, USA). Un contrôle positif visant à induire l'expression/l'accumulation de HIF-1α a également été réalisé en incubant des cellules CTL avec 150 µM de CoCl₂ pendant les 16 heures précédant la préparation des lysats.

2.7.2 Préparation des gels

L'électrophorèse sur gel permet la migration des protéines en fonction de leur poids moléculaire et ce, grâce à l'application d'un champ électrique. Au cours de ce mémoire, aussi bien des gels coulés et des gels précoulés NuPage (Invitrogen, USA) (voir **Tableau 2.10**) ont été utilisés. Après avoir monté le système de plaques en verre, le gel SDS-PAGE séparateur (**Tableau 2.11**) est coulé et une fine couche d'isopropanol est ajoutée pour permettre la polymérisation du gel en absence d'oxygène. Le tétraméthyl éthylène diamine (TEMED) tout comme le persulfate d'ammonium (APS) sont ajoutés à la solution de gel afin de permettre la

Tableau 2.12. Composition du gel concentrateur :

Composition	Concentration finale
Tris-HCl (Merck, Allemagne)	0,28 M ; pH 6,8
SDS (MP Bimedicals, France)	7 %
Acrylamide Ilbis (Bio-Rad, USA)	5 %
APS (Amersham Biosciences, UK)	0,1 %
TEMED (Amersham Biosciences, UK)	0,15 %

Tableau 2.13. Composition du tampon de migration :

Composition	Concentration finale
Tris-HCl (Merck, Allemagne)	50 mM ; pH 8,8
Glycine (Merck, Allemagne)	0,3 M
SDS (MP Biomedicals, France)	1 %

Tableau 2.14. Composition du tampon de transfert :

Composition	Concentration finale
Bicine (Sigma, USA)	500 mM
Bis-Tris (Merck, Allemagne)	500 mM
EDTA (Merck, Allemagne)	20,5 mM
Chlorobutanol (Merck, Allemagne)	1 mM
Méthanol (Acros Organics, Pays-Bas)	10 %

Tableau 2.15. Liste des anticorps utilisés

Ac dirigé contre	Ac 1 ^{ère} et dilution	Espèce	Ac 2 nd et dilution
Mfn 1	IgG anti-Mfn 1 (WH0055669M4 Sigma-Aldrich) Dilution: 1000 x	Souris	Anti-IgG de souris IRDYE 800 nm (Licor Biosciences, USA) Dilution 5000 x
Opa 1	IgG anti Opa-1 (612606, BD - transduction, USA) Dilution: 1000 x	Souris	Anti-IgG de souris IRDYE 800 nm (Licor Biosciences, USA) Dilution 10 000 x
Drp1	IgG anti-Drp 1 (611113, BD - Transduction, USA) Dilution 1000 x	Souris	Anti-IgG de souris IRDYE 800 nm (Licor Biosciences, USA) Dilution 10 000 x
Fis 1	IgG anti-Fis 1 (HPA017430 Sigma- Aldrich) Dilution: 1000 x	Lapin	Anti-IgG de lapin IRDYE 800 nm (Licor Biosciences, USA) Dilution 5000 x
α -tubuline	IgG anti- α -tubuline (MS581PCL, Labdivision, USA) Dilution: 20 000 x	Souris	Anti-IgG de souris IRDYE 700 nm (Licor Biosciences, USA) Dilution 10 000 x
Bnip3	IgG anti-Bnip3 (B7931 Sigma Aldrich) Dilution : 500 x	Souris	Anti-IgG de souris IRDYE 800 nm (Licor Biosciences, USA) Dilution 10 000 x

Tableau 2.16 Composition du TBS-Tween :

Composition	Concentration finale
Tris-HCl (Merck, Allemagne)	15 mM ; pH 7,5
NaCl (Merck, Allemagne)	150 mM
Tween (Sigma, USA)	0,1 %

Tableau 2.17. Liste des anticorps utilisés (chémiluminescence)

Ac dirigé contre	Ac 1^{ère} et dilution	Espèce	Ac 2nd et dilution
HIF-1 α	IgG anti-HIF-1 α (610958 BD- Transduction) Dilution 1500 x	Souris	Anti-IgG de souris HRP (NA931V, Amersham, USA) Dilution 300 000 x
α -tubuline	IgG anti- α -tubuline (MS581PCL, Labdivision, USA) Dilution: 40 000 x	Souris	Anti-IgG de souris HRP (NA931V, Amersham, USA) Dilution 300 000 x

polymérisation de celui-ci (**Figure 2.3**). Une fois le gel séparateur polymérisé (environ 1 h), l'isopropanol est rincé et le gel concentrateur est coulé par-dessus le premier gel (**Tableau 2.12**). Un peigne est alors placé dans le but de former des puits nécessaires au chargement des échantillons. Après environ 45 min de polymérisation, le peigne est retiré, et les puits sont rincés avec du tampon de migration (**Tableau 2.13**). Les échantillons sont chargés sur le gel, et celui-ci est placé dans une cuve d'électrophorèse remplie de tampon de migration. Les échantillons sont finalement soumis à un courant électrique d'intensité de 35 mA/par gel pendant 30 min, le temps de passer du gel concentrateur au gel séparateur, et ensuite à une intensité de 45 mA/gel pendant 3 h pour la résolution complète des protéines.

2.7.3 Préparation de la membrane et transfert des protéines

Une fois la migration terminée, le gel est démoulé et placé dans un système de sandwich. Pour ce faire, une éponge imbibée de tampon de transfert (**Tableau 2.14**) est premièrement déposée dans la cuve de transfert, suivie de 2 papiers Whatman également imbibés et de la membrane PolyVinylidèneDiFluoride (PVDF) (Milipore, USA). Cette dernière aura préalablement été incubée dans du méthanol pendant 1 min puis équilibrée dans du tampon de transfert pendant 5 min. Le gel est alors rincé avec du tampon de transfert puis déposé sur le montage. Il est ensuite recouvert de 2 autres papiers de Whatman et d'une deuxième éponge imbibée de tampon de transfert. Le transfert des protéines sur la membrane peut alors commencer. Il s'agit d'un transfert semi-sec de 2 h en réponse à l'application d'un courant électrique d'une intensité constante proportionnelle à la surface de la membrane (surface x 1 mA).

2.7.4 Incubation de la membrane avec les anticorps primaires et secondaires

2.7.4.1 Fluorescence

Une fois le transfert terminé, le système de sandwich est démoulé et la membrane est premièrement bloquée pendant 1 h dans une solution bloquante (LI-COR Odyssey Infrared Imaging System Blocking Buffer) (Sigma, USA) diluée 2 x dans du PBS (**Tableau 2.2**). Cette première étape est réalisée pour bloquer les sites de liaison non spécifiques aux anticorps, ce qui permet de diminuer le bruit de fond. L'anticorps primaire dilué de manière appropriée (**Tableau 2.15**) dans une solution LI-COR + Tween 0,1 % (Sigma, USA) est ensuite ajouté pendant 16 h (4°C). Après incubation, la membrane est rincée 4 x 5 min avec du PBS + Tween 0,1 %, tandis que l'anticorps primaire est récupéré et conservé à -20°C. Une fois les rinçages terminés, la membrane est mise en présence de l'anticorps secondaire. Celui-ci est dilué entre 5000 et 10 000 x dans une solution LI-COR + Tween 0,1% et ajouté pendant 1 h à température ambiante (et à l'obscurité). Pour terminer, la membrane est rincée 4 x 5 min avec du PBS + Tween 0,1%, puis 2 x dans du PBS sans Tween, avant d'être séchée à 37 °C et à l'obscurité.

2.7.4.2 Chémiluminescence

A la fin du transfert, la membrane est bloquée pendant 2 h dans une solution bloquante TBS (Tris Buffered Saline) contenant du Tween 0,1 % (**Tableau 2.16**) et du lait à 2 % (Blocking agent CPK1075, GE Healthcare, USA). L'anticorps primaire est ensuite dilué de manière appropriée (**Tableau 2.17**) dans une solution TBS + Tween 0,1 % contenant du lait à 2 % et incubé à 4°C pendant 16 h. La membrane est ensuite rincée 3 x 15 min avec du TBS + Tween 0,1 % et mise en présence de l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase de raifort (HRP : Horse Radish Peroxidase). Celui-ci est dilué entre 100 000 et 300 000 fois dans une solution TBS contenant du Tween 0,1% et du lait 2 à %, puis incubé pendant 1 h à température ambiante. La membrane est alors rincée 3 x 15 min avec du TBS + Tween 0,1%.

Tableau 2.18. Composition du PBS + Triton X-100 :

Composition	Concentration finale
NaCl (Merck, Allemagne)	150 mM,
KH ₂ PO ₄ (Merck, Allemagne)	100 mM ; pH 7,4
K ₂ HPO ₄ (Merck, Allemagne)	100 mM
Triton X-100 (Merck, Allemagne)	1 %

Tableau 2.19. Composition du PBS + ABS 1 % :

Composition	Concentration finale
NaCl (Merck, Allemagne)	150 mM,
KH ₂ PO ₄	100 mM ; pH 7,4
K ₂ HPO ₄	100 mM
ABS	1 %

Tableau 2.20. Liste des anticorps utilisés

Ac dirigé contre	Ac 1 ^{ère} et dilution	Espèce	Ac 2 nd et dilution
Drp1	IgG anti-Drp 1 (611113, BD - Transduction, USA) Dilution 100 x Overnight	Souris	Anti-IgG de souris Alexa Fluor 488 (A11001 Molecular Probes) Dilution 1000 x
Fis 1	IgG anti-Fis 1 (HPA017430 Sigma- Aldrich) Dilution: 100 x Overnight	Lapin	Anti-IgG de lapin Alexa Fluor 647 (A21244, Molecular Probes) Dilution 1000 x
HIF 1- α	IgG anti-HIF-1 α (610958 BD- Transduction) Dilution 100 x 2 heures	Souris	Anti-IgG de souris Alexa Fluor 488 (A11001 Molecular Probes) Dilution 1000 x

La révélation des bandes d'intérêt se fait à l'aide de la solution ECL (Enhanced Chemiluminescence) Advance (GE Healthcare, USA) pendant 5 min. La membrane est finalement placée entre deux feuilles transparentes avant d'être analysée à l'aide d'une caméra Fujifilm CCD (Charge-Coupled Device) d'un appareil ImageQuant™ biomolecular imager (GE Healthcare, USA).

2.7.5 Révélation et quantification

2.7.5.1 Fluorescence

La dernière étape du Western Blot est la révélation des bandes protéiques d'intérêt par fluorescence. Celle-ci est réalisée par l'intermédiaire d'un scanner Odyssey LI-COR capable de détecter la fluorescence émise par le fluorochrome couplé à l'anticorps secondaire (détection à 800 nm ou 700 nm). Les bandes obtenues sont ensuite quantifiées à l'aide du logiciel Odyssey et normalisées, respectivement, par les valeurs d'intensité de fluorescence des bandes correspondant à l'immuno-détection de l' α -tubuline, utilisée comme contrôle de charge.

2.7.5.2 Chémiluminescence

La révélation des bandes d'intérêt par chémiluminescence est réalisée par l'intermédiaire d'une caméra Fujifilm CCD de l'appareil ImageQuant™ biomolecular imager (GE Healthcare, USA). L'anticorps secondaire est couplé à la peroxydase de raifort (HRP) qui, une fois en présence de la solution ECL, convertit et oxyde un substrat comme le luminol (solution ECL) dans une réaction produisant de la lumière. Le nombre de photons émis est directement proportionnel à la quantité de protéines présente, et est analysé à l'aide de la caméra CCD. Celle-ci va restituer une image numérique des bandes protéiques obtenues.

2.8 *Immunofluorescence :*

2.8.1 Principe

Le marquage de protéines par immunofluorescence est une technique utilisée dans le but de localiser une ou plusieurs protéines d'intérêt dans une cellule, et d'analyser leur abondance relative. Pour y parvenir, un anticorps primaire dirigé contre une protéine d'intérêt est à son tour reconnu par un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome. Lorsque ce dernier est excité par un laser, il émet un signal de fluorescence qui sera analysé au microscope confocal, ce qui permet de détecter la protéine cible.

2.8.2 Protocole

Les cellules CTL et LINCL sont repiquées sur des lamelles couvre-objets (Vel, Allemagne) dans des boîtes de culture à 24 puits (Costar, USA) à une densité de 4000 cellules/puits. Après 7 jours, le temps de permettre la restauration de l'activité enzymatique de la TPP-1 dans les fibroblastes LINCL + TPP-1, les cellules sont rincées 3 fois avec 1 ml de PBS préchauffé à 37 °C, puis fixées pendant 10 min avec 500 μ l de paraformaldéhyde (PFA) (4 %). Cette fixation permet de conserver, sans modification, les structures cellulaires correspondant à l'état dans lequel elles étaient dans les cellules vivantes. Les cellules sont alors rincées 3 fois avec 1 ml de PBS préchauffé et perméabilisées pendant 5 min au moyen de PBS + Triton X-100 (1 %) (**Tableau 2.18**). Cette étape a pour but de permettre l'entrée des anticorps au sein des cellules. Les cellules sont ensuite rincées 2 fois avec du PBS-ABS (1 %) (**Tableau 2.19**). Dans une chambre humide, sont déposés 30 μ l d'anticorps primaire dilué 100 fois dans du PBS-ABS (1 %). Les cellules fixées et perméabilisées sont incubées en présence de l'anticorps primaire pendant 2 h à température ambiante (HIF-1 α) ou pendant 16 h à 4 °C (FIS1 ; DRP1) (**Tableau 2.20**). Les cellules sont ensuite rincées à trois reprises avec du PBS-

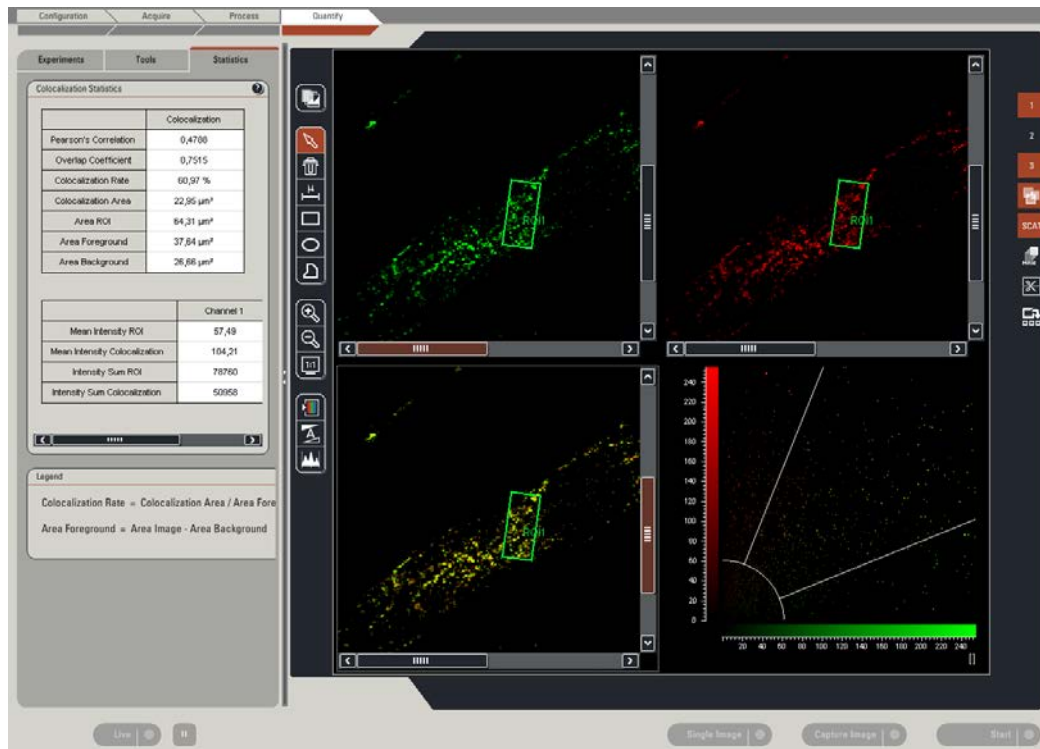


Figure 2.4. Quantification de la colocalisation à l'aide du logiciel Leica LAS AF :

Le logiciel Leica LAS AF permet de déterminer le pourcentage de colocalisation d'une zone déterminée. Après avoir déterminé le seuil du threshold et sélectionné la zone d'intérêt, le logiciel se base sur une étude de pixels afin de déterminer le pourcentage de colocalisation dans la zone sélectionnée.

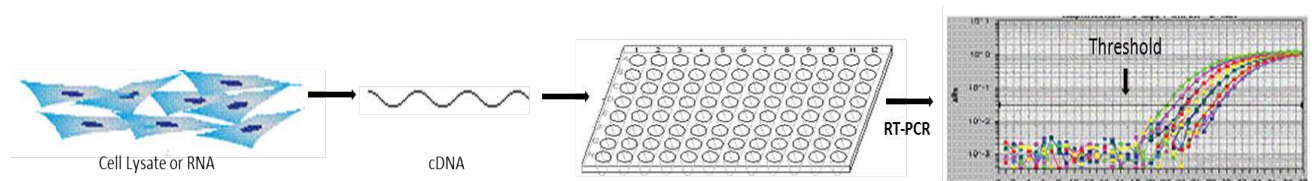


Figure 2.5: Principe de la RT-PCR en temps réel.

Afin d'étudier l'expression d'un gène d'intérêt au niveau du transcrit, l'abondance relative de son ARNm est déterminée. Ce dernier est premièrement rétro-transcrit en ADNc. En effet, étant peu stable, l'ARNm doit d'abord être converti en ADNc par une rétro-transcription, réaction catalysée par une transcriptase inverse. C'est l'ADNc ainsi obtenu qui sera amplifié par PCR. Le SYBR Green (Invitrogen, Pays-Bas) est un agent intercalant de l'ADN qui est utilisé dans le but de quantifier l'amplification de l'ADNc en temps réel. Une fois intercalé entre les brins complémentaires de l'ADNc, le SYBR Green émet un signal de fluorescence pouvant être mesuré. Ce signal est directement proportionnel au nombre de copies d'ADN obtenues au cours de la PCR. Au début de la réaction, les réactifs sont excès. De ce fait, l'amplification sera, dans un premier temps, exponentielle. La valeur Ct (cycle threshold) correspond au nombre de cycles d'amplification nécessaire pour que le signal de fluorescence dépasse celui du bruit de fond. Cette valeur Ct est mesurable et est inversement proportionnelle à la concentration d'ADNc de départ. Finalement, les résultats obtenus sont calculés par la méthode du $\Delta\Delta\text{Ct}$ permettant d'obtenir l'expression relative des transcrits normalisés par les valeurs d'un gène de référence (dans nos conditions expérimentale la glyceraldehyde 3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) a été utilisée). Ce gène de référence est choisi en raison du fait que son expression ne varie pas entre les différentes conditions expérimentales examinées. (D'après Dorak, 2006)

Tableau 2.21. Composition du mini Kit RNeasy :

Composition

- RNeasy Mini Spin Columns
- Collection Tubes (1.5 ml)
- Collection Tubes (2 ml)
- Buffer RLT
- Buffer RW1
- Buffer RPE
- RNase-Free Water

Tableau 2.22. Composition du Kit First Strand cDNA synthesis :

Composition

- 1. Reverse transcriptase (0,5 µl)
- 2. Tampon (4 µl)
- 3. Inhibiteurs de ribonucléases (0,5 µl)
- 4. Mix dNTP (2 µl)
- 5. Oligo dT (1 µl)
- 9. RNase Free Water

ABS (1 %) avant d'être incubées en présence de l'anticorps secondaire adéquat préalablement dilué dans du PBS + ABS (1 %) pendant 1 h à température ambiante et à l'obscurité. Les cellules sont alors rincées 3 fois à l'aide de PBS + ABS (1 %), puis 1 fois au PBS seul, avant d'être incubées pendant 35 min en présence de 30 µl de TO-PRO 3 Iode (Molecular Probes, USA) dilué 80 fois dans une solution RNase (Ribonuclease beef pancréas, IGN, USA). Le TO-PRO 3 Iode est un agent intercalant de l'ADN et est utilisé dans le but de marquer les noyaux cellulaires. Les cellules sont finalement rincées 3 fois avec du PBS et montés sur des lames porte-objets au moyen d'une goutte de Mowiol (Sigma Aldrich, Allemagne) préchauffé à 56 °C. Ces lames sont conservées à 4 °C jusqu'à l'observation au microscope confocal (Leica).

Pour l'étude de la colocalisation de FIS1 et DRP1, les images obtenues au microscope confocal ont ensuite été quantifiées à l'aide du logiciel Leica LAS AF. Celui-ci permet de déterminer le pourcentage de colocalisation d'une zone pré-définie en se basant sur l'étude de pixels (pixels « verts », pixels « rouges », pixels « orange ») (Leica) (**Figure 2.4**).

2.9 Analyse d'expression de gènes : PCR en temps réel et PCR Array

2.9.1 Principe

La PCR (Polymerase Chain Reaction) en temps réel est une méthode utilisée dans le but de quantifier l'abondance relative d'un ARNm dans un échantillon donné permettant ainsi d'étudier le niveau d'expression d'un gène cible. Cette méthode repose sur le principe de la PCR qui, en présence d'une polymérase thermo-réactive, d'amorces et de nucléotides, permet d'amplifier de petites quantités d'ADN. Cette technique est dite en « temps réel » car l'analyse de l'augmentation de la quantité d'ADN est réalisée au cours du temps (**Figure 2.5**) [176]. La technique du PCR Array permet de quantifier l'abondance relative d'une série de gènes représentatifs d'une voie biologique ou d'une maladie donnée (Qiagen, USA). Deux sets de PCR-Array ont été utilisés au cours de ce mémoire dans le but de déterminer les effets potentiels d'une déficience en TPP-1 sur l'expression de gènes nucléaires codant pour des protéines mitochondriales (Qiagen PAHS-087), et plus spécifiquement des protéines impliquées dans la chaîne de transport des électrons (Qiagen PAHS-008).

2.9.2 Extraction de l'ARN et rétrotranscription:

L'extraction de l'ARN total est réalisée en conditions RNase Free à partir du mini kit RNeasy (Qiagen, USA) (**Tableau 2.21**). Les fibroblastes CTL, LINCL et LINCL + TPP-1 arrivés à confluence sont rincés avec 10 ml de PBS froid (4 °C). Les cellules sont ensuite collectées dans 350 µl de tampon de lyse RLT (Kit) et déposées dans des tubes de 2 ml pour une extraction dans le QIAcube (Qiagen, USA). Le tampon RLT contient de la guanidine-thiocyanate, un agent hautement dénaturant permettant d'inactiver les RNases présentes. Cette étape est importante car elle permet de conserver l'ARN intacte pendant l'extraction. L'éthanol est ensuite ajouté et les échantillons sont transférés sur les colonnes, où l'ARN se lie à la membrane de silice tandis que les contaminants sont éliminés. L'ARN est ensuite élué dans 30 à 100 µl d'eau RNase-Free. Seules les molécules d'ARN plus grandes que 200 nucléotides sont purifiées. Etant donné que la plupart des ARN (ARNr, ARNt) ont une taille inférieure à 200 nucléotides, les extraits obtenus sont enrichis en ARNm. Au terme de l'extraction, l'ARN total est quantifié à l'aide du spectrophotomètre NanoDrop 2000 puis rétro-transcrit grâce au kit « First Strand cDNA » synthesis kit (Roche, USA) (**Tableau 2.22**). La rétro-transcription est réalisée à partir d'1 µg d'ARN total dilué dans de l'eau distillée (MilliQ) pour atteindre un volume final de 12 µl. La mixture réactionnelle est complétée par 1 µl d'oligo-dT (amorces), puis est chauffée pendant 10 min à 65 °C dans le but de dénaturer les structures secondaires potentiellement présentes au niveau des ARNm. L'échantillon est

Tableau 2.23. Composition de la mixture réactionnelle pour la PCR:

Composition	Volume finale/puits
Amorces forward 3 µM (tableau 2.22)	2,5 µl
Amorce reverse 3 µM (tableau 2.22)	2,5 µl
Eau distillée (MilliQ)	2,5 µl
Mix SYBR green (Invitrogen, Pays-Bas)	12,5 µl

2.24. Liste des amorces utilisées :

nom	Primer F	Primer R
MFN1	5'-GAACCTTTTAACACTGGATGTAAAGAAA-3'	5'-TCTGTCATTGCACATGAACTTTG
MFN2	5'-CATGAGGCCTTTCTCCTTACC-3'	5'-CCAGCTGGTTCACAGTCTTG
DRP1	GTCATGCCGTGAACCTGCTA-3'	5'-AACCTCACAATCTCGCTGTTCC
OPA1	5'-GACTTTGCGGAGGACAGCTT-3'	5'-CTGCATCCCATTGCTGTTTAT-3'
FIS1	5'-AATGATGACATCCGTAAAGGCA-3'	5'-TCCTCCTTGCTCCCTTTGG
LHPPF	5'-CCTACATGAAGGCGCTTGAG-3'	5'-TTGCAGGGCAGACTTGAA
COX6F	5'-GCTGTAGCATTCTGTGCTATCC-3'	5'-TGCGTACTTCTTTCTTTG
SDHCF	5'-TCCTCTGTCTCCCCACATTAC-3'	5'-CTGCACTCAAAGCAATACCACT
ATP5G3F	5'-TCCCACTCCTTCGACCTCT-3'	5'-TCTTACACTCTTCGGGACTGC
SOD1F	5'-TCATCAATTTGAGCAGAAGG-3'	5'-CAGGCCTTCAGTCAGTCCTTT
Bnip3	5'-ACCAAGTCAGACTCCAGTTCT-3'	5'-TTTGCTGGCCATCGGATT
GAPDH	5'-ACCACTCCTCCACCTTTGAC-3'	5'-GTCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

Tableau 2.25. Composition du kit RT² First Strand C-03/330401 :

Composition - GE : 5 x gDNA Elimination Buffer - BC3: 5 x Reverse transcription Buffer 3 - H ₂ O RNase Free - P2: Primer and External Control Mix - RE3: RT Enzyme Mix 3

Tableau 2.26. Composition du cocktail RT :

Composition	Volume final
RT Buffer	16 µl
Primer & External Control Mix	4 µl
RT enzyme Mix	8 µl
H ₂ O RNase free	12 µl

Tableau 2.27. Composition de la mixture PCR :

Composition	Volume final
SABiosciences RT-qPCR Master Mix	1350 µl
First Strand cDNA synthesis reaction	102 µl
H ₂ O distillée (MilliQ)	1248 µl

ensuite spiné et déposé sur glace et 7 µl de la mixture composée des solutions 1, 2, 3 et 4 (**Tableau 2.22**) sont ajoutés. La solution est mise à incuber pendant 30 min à 55 °C afin de permettre la polymérisation de l'ADNc par la polymérase. L'enzyme est ensuite inhibée par une incubation de 5 min à 85 °C (dénaturation thermique). L'échantillon est finalement placé sur glace et l'ADNc est conservé à -20 °C ou utilisé directement pour la PCR en temps réel.

2.9.3 PCR en temps réel

Afin de réaliser la PCR, 20 µl d'une mixture PCR (**Tableau 2.23**) sont ajoutés dans les puits d'une plaque à 96 puits (Applied Biosystems, Pays-Bas). On ajoute ensuite 5 µl d'ADNc dilué 100 x dans de l'eau distillée (MilliQ). La plaque est alors scellée et centrifugée 30 s à 600 rpm, puis déposée dans l'appareil RT-qPCR ABI Prim 7000 (Applied Biosystems, Pays-Bas). La PCR commence par une première étape de dénaturation de 10 min à 95 °C afin de dénaturer les brins d'ADNc suivie de 40 cycles alternant un refroidissement à 60 °C pendant 1 min permettant la liaison des amorces aux brins d'ADNc et leur élongation; suivi d'une hausse de la température à 95 °C pendant 15 s permettant une étape de dénaturation afin de séparer les nouveaux brins d'ADNc formés. Le SYBR Green s'intercale entre les brins d'ADNc nouvellement formés et une détermination du signal de fluorescence est réalisée lors de chaque cycle, avant l'étape de dénaturation. Une fois les valeurs de Ct obtenues pour le gène d'intérêt et le gène de référence, le calcul selon la méthode du $\Delta\Delta Ct$ est réalisé dans le but d'obtenir l'expression relative du transcrit par rapport au gène de référence [176]. Les résultats sont exprimés en « nombre de fois d'augmentation » (Fold Induction) avec le gène codant pour la glyceraldehyde 3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) utilisé comme gène de référence.

$$\Delta Ct = Ct_{\text{gène d'intérêt}} - Ct_{\text{gène de référence}}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{gène dans une condition particulière}} - \Delta Ct_{\text{contrôle}}$$

$$\text{Fold Induction} = 2^{(-\Delta\Delta Ct)}$$

2.9.4 PCR Array

Cette méthode commence par l'extraction de l'ARN total au moyen du mini Kit QIAgen, comme expliqué au point 2.9.2. Après avoir quantifié l'ARN à l'aide du spectrophotomètre NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), un équivalent de 5 µg d'ARN est rétrotranscrit en ADNc en utilisant le kit RT² « First Strand cDNA » (Qiagen, USA) (**Tableau 2.25**). L'ADNc obtenu (porté à 8 µl) est mélangé à 2 µl de la mixture d'élimination de l'ADN génomique et incubé pendant 5 min à 42 °C. La solution est ensuite refroidie à 4 °C pendant 1 min et 10 µl d'un cocktail RT (**Tableau 2.26**) sont ajoutés. La réaction de polymérisation de l'ADNc a ensuite lieu pendant une incubation de 15 min à 42 °C. L'arrêt de la réaction est réalisé par un passage à 95 °C pendant 5 min. Finalement, 91 µl d'eau distillée sont ajoutés et le PCR Array peut avoir lieu. Pour ce faire, 25 µl d'une mixture PCR (**Tableau 2.27**) sont déposés dans chaque puits du PCR Array (Qiagen, USA). La plaque est alors scellée et centrifugée 1 min à 1000 g avant d'être placée dans l'appareil PCR (Applied Biosystems, USA).

2.10 *Dosage de l'ATP :*

2.10.1 Principe

Le dosage de l'ATP intracellulaire est basé sur la capacité de la luciférase à catalyser la réaction d'oxydation de la luciférine en oxyluciférine en présence d'ATP, d'O₂ et de Mg²⁺ (Sigma, USA). Le nombre de photons libérés lors de cette réaction est directement proportionnelle à la concentration d'ATP et peut être quantifiée à l'aide d'un luminomètre (Berthod Detection System FB12).

Tableau 2.28. Composition du tampon HBSS (Hanks Balanced Salt Solution) :

Composition	Concentration finale
NaCl (Merck, Allemagne)	370 mM
KCl (Merck, Allemagne)	5,36 mM
MgCl ₂ (Merck, Allemagne)	490 µM
MgSO ₄ (Merck, Allemagne)	830 µM
KH ₂ PO ₄ (Merck, Allemagne)	440 µM ; pH 7,4
Na ₂ HPO ₄ (Merck, Allemagne)	700 µM
Glucose (Merck, Allemagne)	5,55 mM

Tableau 2.29. Composition de la mixture réactionnelle pour le dosage de l'ATP :

Composition	Concentration finale
Glycine (Merck, Allemagne)	75 mM
HEPES (Acros Organics, Pays-Bas)	75 mM, pH 7,7
Dithiothreitol (DTT) (Merck, Allemagne)	75 µM
EDTA (Merck, Allemagne)	125 µM
MgCl ₂ (Merck, Allemagne)	6,25 mM
Sucrose	97,5 mg/ml
Solution luciférine (tableau 2.30)	21 µl/ml
Solution luciférase (tableau 2.31)	10,5 µl/ml

Tableau 2.30. Composition de la solution luciférine :

Composition	Concentration finale
Tris-HCl (Merck, Allemagne)	25 mM ; pH 7,7
Dithiothreitol (DTT) (Merck, Allemagne)	75 µM
MgCl ₂ (Merck, Allemagne)	6,25 mM
Luciférine (Sigma, USA)	2 mg/ml
EDTA (Merck, Allemagne)	125 µM

Tableau 2.31. Composition de la solution luciférase :

Composition	Concentration finale
Glycine (Merck, Allemagne)	0,5 M
Luciférase (Sigma, USA)	2 mg/ml

Tableau 2.32. Composition du tampon HEPES :

Composition	Concentration finale
HEPES (Acros Organics, Pays-Bas)	10 mM ; pH 7,4
NaCl (Merck, Allemagne)	150 mM
KCl (Merck, Allemagne)	5 mM
MgCl ₂ (Merck, Allemagne)	1 mM

2.10.2 Protocole

Les fibroblastes CTL et LINCL arrivés à confluence sont repiqués dans des boîtes de culture à 6 puits (Costar) à une densité de 40 000 cellules/puits. Après 7 jours d'incubation, le temps de permettre la restauration de la TPP-1 dans les cellules LINCL + TPP-1, les cellules sont rincées avec 2 ml de Hanks Balanced Salt Solution (HBSS) (**Tableau 2.28**). Les cellules sont ensuite incubées pendant 10 s en présence de 500 µl de la solution « ATP releasing agent » (Sigma, Allemagne) pour extraire l'ATP des cellules. Cette solution contenant l'ATP est alors récoltée dans des microtubes (Sarstaedt, Allemagne) et stockée à -70 °C jusqu'au dosage. Lors du dosage, 100 µl d'une mixture réactionnelle « ATP assay mix » (**Tableau 2.29**) sont déposés dans des tubes à luminescence (Sarstaedt, Allemagne) et mélangés à 100 µl d'échantillons dilués 2 fois dans la solution « ATP releasing agent ». Une mesure de la (bio)luminescence est réalisée directement à l'aide d'un luminomètre (Berthod Detection System FB12). La quantité de cellules est estimée par le dosage (relatif) de l'abondance de l'ADN présent dans chaque tapis cellulaire par la quantification de la fluorescence associée au marquage des cellules à l'iodure de propidium (Sigma, USA), un agent intercalant permettant le marquage des acides nucléiques. Les fibroblastes sont premièrement fixés avec 500 µl de PFA 4 % pendant 10 minutes, et 500 µl d'iodure de propidium dilué dans du PBS (concentration finale : 10 µl/ml) sont ajoutés dans chacun des puits. Les cellules sont alors incubées pendant 30 minutes à l'obscurité, et l'intensité de fluorescence est mesurée au fluoroscan (λ exc. : 518 nm, λ ém. : 612). Les données sont exprimées en unités relatives de luminescence normalisées par le contenu en ADN (URL/ADN).

2.11 Mesure du potentiel de membrane mitochondriale :

2.11.1 Principe

La mesure du potentiel de membrane mitochondriale a été réalisée en cytométrie de flux sur des cellules marquées par la sonde fluorescente TMRE (TetraMethylRhodamine Ethyl ester) dont l'accumulation au sein de la mitochondrie est strictement dépendante du potentiel de membrane mitochondriale [177].

2.11.2 Protocole

Les fibroblastes contrôles, LINCL sont repiqués dans des boîtes de culture à 6 puits (Costar) à une densité de 40 000 cellules/puits. Des cellules LINCL ont également été incubées en présence de TPP-1 pour restaurer l'activité enzymatique (LINCL + TPP-1) (voir point 2.3). Après 7 jours d'incubation, les cellules ont été rincées avec 2 ml de PBS stérile, puis incubées, à 37 °C et à l'obscurité, pendant 30 min en présence de la sonde TMRE à 25 nM diluée dans du milieu MEM complet. Les cellules sont alors rincées avec 2 ml de PBS stérile puis collectées à l'aide de 1 ml de trypsine + EDTA (200 µg/ml). Les cellules sont ensuite diluées dans 2 ml de milieu MEM complet et centrifugées pendant 5 min à 1 000 rpm, à température ambiante. Les cellules sont alors resuspendues dans 500 µl de tampon HEPES (**Tableau 2.32**) et distribuées, sur glace, dans des tubes pour cytomètre de flux (BD Biosciences, USA). Des blancs échantillons (cellules sans sonde) sont réalisés afin de déterminer l'autofluorescence des cellules. Enfin, un contrôle positif est réalisé par des cellules incubées pendant 1 min en présence de FCCP à 20 µM avant la mesure de la fluorescence au cytomètre de flux.

Paramètres : canal FL2 (λ exc. : 436 nm, λ ém. : 637 nm).

2.12 Mesure de la concentration en calcium dans la matrice mitochondriale:

2.12.1 Principe

La concentration (relative) en calcium matriciel est mesurée au moyen de la sonde X-Rhod 5F [178] (Molecular Probes). La concentration en calcium dans la matrice mitochondriale a été analysée dans des cellules à l'état basal mais également après une stimulation des cellules par l'ionomycine, un ionophore calcique spécifique [179], afin de chercher la capacité éventuelle qu'a la mitochondrie à séquestrer le calcium cytosolique libre lors d'une élévation de cette dernière dans des cellules.

2.12.2 Protocole

Les fibroblastes CTL et LINCL arrivés à confluence sont repiqués dans des boîtes de culture à 12 puits (Costar) à une densité de 20 000 cellules/puits. Après 7 jours, le temps d'autoriser la restauration de l'activité enzymatique de la TPP-1 dans les fibroblastes LINCL, les cellules sont rincées 2 fois avec 1 ml de HBSS (**Tableau 2.28**) préchauffé à 37°C. Les cellules sont ensuite incubées pendant 30 min, à l'obscurité et à 37 °C, en présence de la sonde X-Rhod 5F à 2 µM diluée dans du HBSS + CaCl₂ (1 mM). A la fin de l'incubation, les cellules sont rincées 3 fois avec du HBSS + CaCl₂ (1 mM) préchauffé et une première lecture de l'intensité de fluorescence est réalisée l'aide d'un spectrofluorimètre (Fluoroskan Ascent, Thermo Electron Corporation) (λ exc. : 580 nm, λ ém. : 612 nm). Dans le but d'augmenter la concentration en calcium matriciel, dans certaines conditions, des cellules ont été incubées en présence d'ionomycine à 10 µM diluée dans du HBSS + CaCl₂ (1 mM), et l'intensité de fluorescence a ensuite été mesurée toutes les 10 min pendant 30 min. En vue de normaliser les résultats obtenus, l'abondance (relative) de l'ADN présent dans chacun des puits est quantifiée à l'iodure de propidium (voir point 2.10). Les résultats de la mesure du calcium dans la matrice mitochondriale sont donc exprimés en Unités Arbitraires de Fluorescence (UAF) normalisés par les valeurs de fluorescence du contenu en ADN (UAF/ADN).

2.13 Mesure de l'abondance mitochondriale en anions superoxydes :

2.13.1 Principe

La mesure de l'abondance de radicaux libres dérivés de l'oxygène comme les anions superoxydes (O₂^{·(-)}) mitochondriaux a été réalisée sur des cellules marquées au moyen de la sonde MitoSOXTM Red (Molecular Probes). Cette sonde (dérivée du bromure d'éthidium) s'accumule spécifiquement au sein de la matrice mitochondriale où elle réagit de manière spécifique avec les anions superoxydes. L'oxydation de la sonde par les anions superoxydes conduit à une émission de fluorescence (λ exc. : 518 nm, λ ém. : 612 nm) qui sera détectée dans le but de mesurer l'abondance des O₂^{·(-)}.

L'antimycine A (Sigma, USA), un inhibiteur pharmacologique du complexe III de la chaîne respiratoire, est utilisé afin d'induire un stress cellulaire favorisant la production de molécules radicalaires dérivées de l'oxygène par la mitochondrie [88]. Le but étant de mesurer l'abondance des anions superoxydes en conditions basales et après incubation des cellules en présence d'antimycine A, molécule utilisée comme contrôle positif.

2.13.2 Protocole

Les fibroblastes CTL et LINCL arrivés à confluence sont repiqués dans des boîtes de culture à 12 puits (Costar) à une densité de 20 000 cellules/puits. Après 7 jours, le temps d'assurer la restauration de l'activité enzymatique de la TPP-1 dans les cellules LINCL, les cellules sont rincées 2 fois avec 1 ml de HBSS (**Tableau 2.28**) préchauffé à 37 °C. Ensuite, les cellules (à l'exception des blancs) sont incubées pendant 10 min à l'obscurité et à 37°C en

Tableau 2.33. Composition du Kit Luciférase Assay System (Promega):

Composition

- Luciferase Assay Buffer (A)
- Luciferase Assay Substrate (B)
- Reporter Lysis Buffer

présence de 1 ml d'HBSS contenant du CaCl_2 à 1 mM et la sonde MitoSOXTM Red à 10 μM . Les cellules sont ensuite rincées 3 fois avec du HBSS + CaCl_2 1 mM préchauffé, et une première mesure de l'intensité de fluorescence est réalisée au spectrofluorimètre (Fluoroskan Ascent, Thermo Electron Corporation) (λ exc. : 518 nm, λ ém. : 612 nm). Dans certaines conditions, dans le but de stimuler la production d'espèces radicalaires, 2 ml de PBS contenant de l'antimycine A à 10 μM sont ajoutés aux cellules et une mesure de la fluorescence est réalisée toutes les 15 min pendant 45 min. A la fin de l'expérience, les tampons d'incubation sont décantés et 400 μl de NaOH (1 N) sont ajoutés pendant 20 min pour réaliser une lyse alcaline des tapis cellulaires. Les surnageants sont alors prélevés (lysats cellulaires), et un dosage des protéines est réalisée au spectrophotomètre NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Les valeurs obtenues pour la mesure de l'abondance des $\text{O}_2^{\cdot(-)}$ sont exprimées en Unités Arbitraires de Fluorescence (UAF) normalisées par le contenu en protéines (UAF/ μg de protéines).

2.14 Test d'activité transactivatrice du facteur de transcription HIF-1:

2.14.1 Principe

Dans le but d'évaluer l'activité transactivatrice du facteur de transcription HIF-1, les cellules CTL, LINCL et LINCL + TPP-1 ont été co-transfectées avec un plasmide pGL3-(PGK-HRE6)-tk-luc, possédant 6 copies de la séquence consensus (HRE : Hypoxia Responsive Element) reconnue par HIF-1 en amont d'un gène rapporteur codant pour la luciférase et pCMV-LacZ un plasmide contenant le gène rapporteur codant la β -galactosidase [180,181]. La luciférase catalyse la réaction d'oxydation de la luciférine en oxyluciférine en présence d'ATP, d' O_2 et de Mg^{2+} . Le nombre de photons émis au cours de cette réaction est proportionnel à l'activité de la luciférase et donc à l'activité transactivatrice du facteur de transcription HIF-1. Cette activité sera normalisée par l'activité de la β -galactosidase dont l'expression est placée sous le contrôle d'un promoteur CMV (CytoMégaloVirus), utilisée comme contrôle de l'efficacité de transfection.

2.14.2 Protocole

Les cellules CTL et LINCL sont repiquées en plaques 6 puits (Costar) à une densité de 40 000 cellules/puits. 6 jours plus tard, le temps de permettre (en partie) la restauration de l'activité enzymatique de la TPP-1 dans les cellules LINCL + TPP-1, les fibroblastes CTL, LINCL et LINCL + TPP-1 sont transfectés. La transfection est réalisée avec l'agent de transfection Superfect (Qiagen, USA) qui neutralise les charges négatives portées par les groupements phosphates de l'ADN et permet donc son internalisation au sein de la cellule par endocytose non spécifique. Pour la préparation des complexes, dans 75 μl de milieu MEM sans sérum sont ajoutés 1,125 μg de plasmide contenant le gène rapporteur luciférase pGL3-(PGK-HRE6)-tk-luc, et 0,375 μg de plasmide contenant le gène de la β -galactosidase (pCMV-LacZ). Ensuite, on ajoute 7,5 μl de Superfect et la formation des complexes de transfection est réalisée par une incubation de 5-10 min. Les complexes sont ensuite dilués dans 400 μl de milieu MEM complet.

Pour débiter la transfection, les cellules sont rincées 1 fois avec 1 ml de du PBS préchauffé à 37 °C et incubées pendant 3 h en présence de 475 μl de solution ADN/superfect/milieu MEM complet contenant les complexes d'ADN. Pour permettre aux cellules de récupérer (du stress imposé par la transfection), le milieu de transfection est ensuite remplacé par 3 ml de milieu MEM complet pendant 24 h.

Pour le dosage des activités enzymatiques, les cellules sont rincées 1 fois avec 1 ml de PBS et sont lysées pendant 15 min (sous légère agitation et à température ambiante) dans 200 μl de tampon de lyse (kit Luciferase Assay Sytem, Promega, USA) (**Tableau 2.33**). Les lysats

Tableau 2.34. Composition de la mixture réactionnelle permettant de mesurer l'activité de la β -Galactosidase:

Composition	Concentration finale
Tris-HCl (Merck, Allemagne)	21 mM ; pH 7,5
NaCl (Merck, Allemagne)	105 mM
MgCl ₂ (Merck, Allemagne)	1,7 mM
β -mercaptoéthanol (Flukachemi AG, Suisse)	10 mM
4-Methylumbelliferyl β -D-Galactopyranoside	500 μ M

Tableau 2.35. Composition du tampon de lyse du test MTT :

Composition	Concentration finale
SDS (MP Biomedicals, France)	66 %, pH 4,7
N,N-diméthyl-formamide (Merck, Allemagne)	33 %

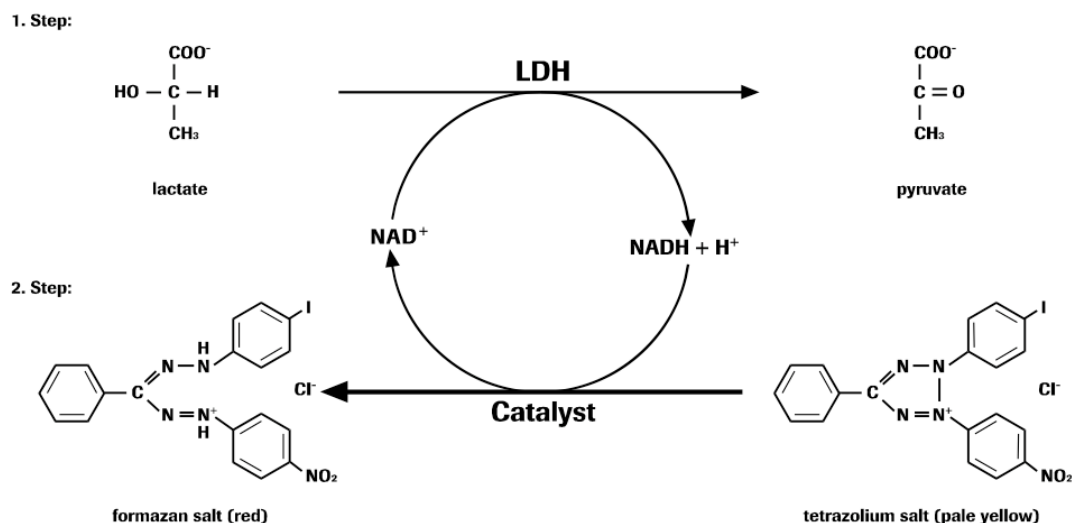


Figure 2.6 : Principe du test de cytotoxicité basé sur la libération de LDH.

En condition physiologique, la lactate déshydrogénase (LDH), enzyme intracellulaire, catalyse les réactions d'oxydo-réductions assurant l'inter-conversion du lactate et du pyruvate couplée à celle du NADH + H⁺ et du NAD⁺ selon l'équation Pyruvate + NADH + H⁺ \rightleftharpoons Lactate + NAD⁺. Lors d'un dommage cellulaire, la LDH est libérée dans le milieu extracellulaire et son activité pourra être dosée dans une réaction en deux étapes à l'aide d'un kit (Roche, USA). Dans un premier temps, la LDH oxyde le lactate en pyruvate et réduit le NAD⁺ en NADH + H⁺. Par la suite, une deuxième enzyme catalyse la réaction de transfert du H/H⁺ du NADH + H⁺ au sel de tetrazolium INT (2-p-iodophenyl-3-p-nitrophenyl-5-phenyl tetrazolium chloride) qui est alors réduit en formazan. L'absorbance de cette molécule est mesurée au spectrophotomètre à 490 nm. La quantité de formazan formée est directement proportionnelle à l'activité de LDH libérée dans le milieu de culture.

sont récoltés dans des microtubes et sont centrifugés 3 min à 13 000 rpm. Pour le dosage de l'activité luciférase, un volume de 20 µl de surnageant (lysat clair) est ensuite mélangé à 100 µl de mixture réactionnelle (composée des solutions A et B, Kit) et la quantification des photons émis (luminescence) est réalisée immédiatement au luminomètre (Bio-Rad, USA). Pour doser l'activité de la β -galactosidase, 20 µl de lysat clair sont ajoutés à 180 µl de mixture réactionnelle (**Tableau 2.34**) et la réaction est réalisée par une incubation de 30 min à 37 °C avant de réaliser une mesure de l'intensité de fluorescence (λ exc. : 365 nm, λ ém. : 450 nm). Les résultats sont finalement normalisés en divisant les valeurs de l'activité de la luciférase exprimée en unités relatives de luminescence (URL) par les valeurs de l'activité de la β -galactosidase, exprimée en unités arbitraires de fluorescence (UAF).

2.15 Méthode au MTT :

2.15.1 Principe

Les cellules métaboliquement actives incorporent le MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-yl)-2,5diphényltriazolium), qui est alors réduit en formazan par l'action de la succinate déshydrogénase, une enzyme mitochondriale. Le formazan forme un précipité insoluble de couleur mauve dont la quantité est proportionnelle au nombre de cellules vivantes. Il est donc possible d'établir une corrélation entre la viabilité/abondance cellulaire et la quantité de MTT réduit (Sigma, USA). Au cours de ce travail, le test MTT a été utilisé afin d'étudier la viabilité cellulaire des cellules CTL incubées pendant 24 h en présence de concentrations croissantes en antimycine A comprises entre 20 µM et 200 µM.

2.15.2 Protocole

Afin d'étudier la viabilité cellulaire en réponse à une incubation des cellules en présence d'une molécule toxique, des concentrations croissantes d'antimycine A (de 20 µM à 200 µM) ont été testées au cours d'une incubation de 24 h. Des cellules CTL ont été repiquées dans des boîtes de culture à 24 puits à une densité de 23 000 cellules/puits. Après 24 h, les cellules ont atteint la confluence (25 000 cellules/puits) et sont rincées avec 1 ml de PBS avant d'être incubées en présence d'antimycine A diluée dans du milieu MEM complet pendant 24 h. Deux types de contrôles sont également prévus, à savoir des cellules non traitées et des cellules incubées en présence d'éthanol seul (350 mM) solvant dans lequel l'antimycine A est solubilisée. Les cellules sont alors incubées pendant 24 h. Au terme de l'incubation, les cellules sont rincées avec 1 ml de PBS. Un volume de 1 ml de colorant MTT (3 mM) (Sigma) dilué dans du milieu MEM complet est ajouté aux cellules (sauf les blancs). Les cellules incubent pendant 2 h à 37 °C dans une atmosphère humide contenant 5 % de CO₂. A la fin de cette incubation, le surnageant est décanté et les cellules sont incubées, pendant 16 h à 37 °C et sous légère agitation rotative, en présence de 1 ml de solution de lyse/solubilisation du formazan (**Tableau 2.35**). Enfin, l'absorbance de la solution de formazan est mesurée au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 570 nm.

2.16 Mesure du relargage de la LDH :

2.16.1 Principe

La LDH (lactate déshydrogénase) est une enzyme cytoplasmique qui est relarguée dans le milieu de culture suite à la perméabilisation de la membrane plasmique au cours de la mort cellulaire (Cytotoxicity detection kit (LDH) Roche). Son activité dans le milieu extracellulaire peut alors être quantifiée par une méthode colorimétrique. Dans ce travail, le relargage de LDH a été utilisé sur les cellules contrôles pour étudier la cytotoxicité de l'antimycine A (Kit Roche, USA) (**Figure 2.6**).

Tableau 2.36. Composition du Kit Roche du test LDH :

Composition

- Catalyst (Diaphorase/NAD + mixture)
- Dye solution (INT and sodium lactate)

Tableau 2.37. Composition du Kit Roche de la mesure de la fragmentation de l'ADN génomique:

Composition

- Solution Anti-histone
- Solution Anti-DNA-POD
- Tampon de Coating
- Tampon de lavage
- Tampon d'incubation
- Tampon substrat
- Substrat ABTS

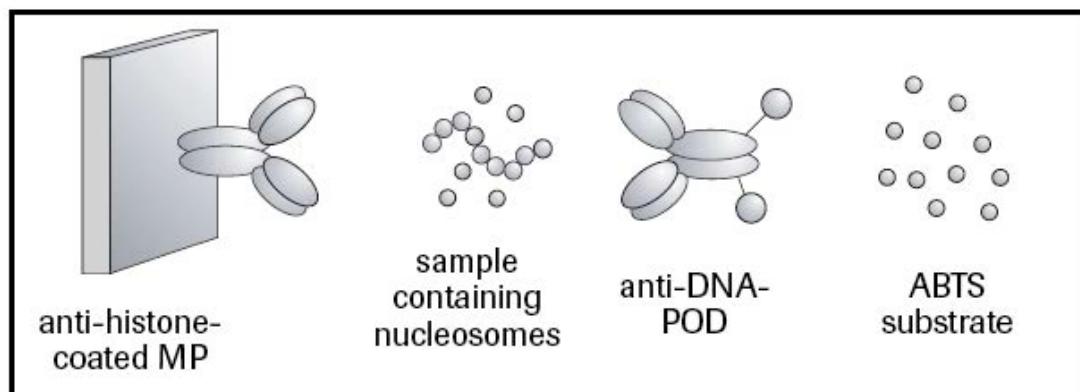


Figure 2.7. Principe du test de mesure de la fragmentation de l'ADN génomique.

La mesure de la fragmentation internucléosomale de l'ADN génomique utilisé comme un marqueur terminal de l'apoptose est réalisé à l'aide d'un test ELISA (Enzyme-Linked ImmuoSorbent Assay) (Roche, USA). Cette technique permet la détection d'un antigène cible (ici les nucléosomes) au sein d'un échantillon (lysate cellulaire). Pour ce faire, des anticorps anti-histones recouvrent les puits d'une plaque 96 puits dans lesquels seront ensuite ajoutés les échantillons. Un anticorps secondaire dirigé contre l'ADN et couplé/conjugué à une peroxydase, est alors ajouté. Le substrat de l'enzyme est ensuite ajoutés (ABTS : 2,2'-azino-di-3-ethylbenzthiazoline sulfonate). Le produit de réaction permet de déterminer l'abondance/l'activité des peroxydases immobilisées dans les complexes immuns, et donc l'abondance des nucléosomes initialement fixés. L'utilisation de deux anticorps différents (un dirigé contre les histones, l'autre contre l'ADN) permet de détecter spécifiquement les nucléosomes.

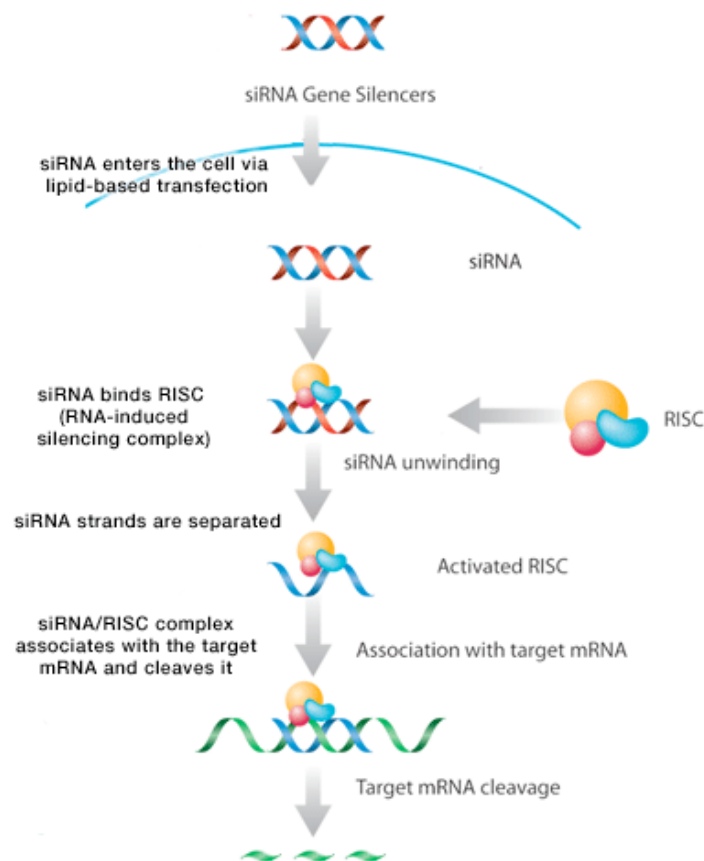


Figure 2.8. Transfection des cellules avec des siRNA : les siRNA sont des ARN doubles brins de 20-25 nucléotides qui vont s'associer au complexe protéique RISC une fois rentrés dans la cellule. Les deux brins du siRNA sont alors séparés, et le complexe RISC/siRNA se lie à une séquence d'ARNm complémentaire. Le clivage par la protéine Argonaute qui s'ensuit au niveau de l'hétéroduplexe assure la dégradation de l'ARNm et empêche sa traduction. Il en résulte un silençage (knockdown) spécifique de l'expression du gène ciblé.

(D'après http://www.scbt.com/fr/gene_silencers.html)

Tableau 2.38 : liste des siRNA utilisés :

Nom	Référence
Bnip3	siGENOME M00463601 Thermo Scientific USA
RISC Free	siGENOME 1234351, Thermo Scientific USA

Tableau 2.39 : Composition du milieu et agents de transfection utilisés :

Composition	Concentration finale
siRNA (tableau 2.39)	10 nM
Dharmafect 1 (Thermo Scientific, USA)	500 x
OptiMEM (Gibco)	5 x

2.16.2 Protocole

Des cellules CTL à confluence sont repiquées dans des boîtes de culture à 24 puits (Costar) à une densité de 23 000 cellules/puits. Le lendemain, les cellules ont atteint la confluence (25 000 cellules/puits) et sont rincées avec 1 ml de PBS. Dans certaines conditions, l'inhibition de l'activité respiratoire mitochondriale est initiée par l'addition de 1 ml d'une solution d'antimycine A (concentrations allant de 20 µM à 200 µM) diluée dans du milieu MEM complet. Les cellules sont ensuite incubées pendant 24 h. Au terme de l'incubation, les surnageants sont placés sur glace dans des microtubes (Saerstedt, Allemagne) qui sont centrifugés 5 min à 2000 rpm pour récupérer les cellules qui se seraient détachées (culots). Les surnageants sont ensuite transférés dans de nouveaux microtubes (surnageants), tandis que les culots sont resuspendus dans 250 µl de PBS-Triton X-100 (10 %). Les tapis cellulaires sont également lysés (10 min sous une légère agitation rotative) en présence de 250 µl de PBS-Triton X-100 (10 %). Les lysats sont alors récupérés sur glace dans microtubes (lysats). La mesure du relargage de la LDH est expliquée dans le Kit Roche et les instructions recommandées ont été suivies (**Tableau 2.36**).

Le pourcentage de cytotoxicité est finalement calculé selon la formule :

$$\% \text{ cytotoxicité} = \frac{100 \times ((\text{culot-blanc}) + (\text{surnageant-blanc}) \times 4)}{((\text{culot-blanc}) + (\text{surnageant-blanc}) \times 4 + (\text{lysats-blanc}) \times 20)}$$

2.17 Mesure de la fragmentation de l'ADN génomique :

2.17.1 Principe

Lors de l'apoptose, l'ADN génomique est clivé par une endonucléase DFF40/CAD (DNA fragmentation factor-40/caspase-activated deoxyribonuclease) au niveau des régions internucléosomales. Les mono- et oligo-nucléosomes générés suite à l'action de la DFF40/CAD, peuvent être détectés par test ELISA (Kit Roche) (**Tableau 2.37**) et l'étude des fragments d'ADN permettra d'évaluer la mortalité par apoptose (Roche, USA). Dans ce travail, nous avons recherché l'effet d'une incubation des cellules en présence d'antimycine A à une concentration de 200 µM sur la fragmentation de l'ADN génomique (**Figure 2.7**).

2.17.2 Protocole

Les fibroblastes CTL et LINCL sont ensemencés à une densité de 4 000 cellules/puits dans une boîte de culture à 24 puits (Costar). Dans la condition LINCL + TPP-1, les cellules ont été incubées en présence de la pro-enzyme TPP-1 pendant 48 h puis maintenues en culture pendant 4 jours dans du milieu sans enzyme. Au terme de ces 6 jours, les cellules CTL, LINCL et LINCL + TPP-1 sont rincées 1 x avec du PBS, et sont incubées pendant 24 h en présence d'antimycine A à la concentration de 200 µM. Les milieux de culture sont alors prélevés dans des microtubes (Saerstedt, Allemagne) et sont centrifugés à 2000 rpm pendant 3 min et à 4 °C, tandis qu'un volume de 150 µl de tampon d'incubation (kit) est déposé sur le tapis cellulaire. Les culots sont ensuite resuspendus dans 100 µl de tampon d'incubation et ajoutés aux tapis cellulaires (pool). Au terme d'une incubation de 30 min, les solutions sont homogénéisées (à la pipette) puis centrifugées pendant 7 min à 13 000 rpm et à 4 °C. Le surnageant est récupéré et stocké à - 20 °C jusqu'au dosage. Pour le dosage, voir les instructions du Kit Cell Death (Roche, USA).

2.18 ARN interférence et transfection des cellules avec des siRNA :

La transfection des cellules avec des siRNA (small interfering RNA) consiste en l'introduction d'ARN (duplex ARN) dans des cellules dans le but d'inhiber l'expression d'un gène cible (**Figure 2.8**) (**Tableau 2.38**). Dans le cadre de ce travail, nous avons invalidé

l'expression de Bnip3 dans les cellules LINCL en utilisant des siRNA dirigés contre son transcrit.

Les cellules LINCL sontensemencées dans des boîtes de culture de 25cm² à une densité de 350 000 cellules/boîte. Le lendemain, les siRNAs sont dilués dans de l'Opti-MEM (Gibco, UK) à la concentration de 10 nM (solution A). Dans un deuxième tube, l'agent transfectant, le DharmaFECT 1 (Thermo Scientific, USA) est dilué dans de l'Opti MEM, concentré 500 fois par rapport au volume final à ajouter aux cellules (solution B). Le DharmaFECT 1 contient un lipide cationique qui neutralise les charges négatives portées par les siRNA et permet leur internalisation au sein des cellules suite à la formation de complexes lipides-siRNA, qui passent facilement au travers de la membrane plasmique (Thermo Scientific, USA) [182]. La transfection d'un siRNA Non-Targeting siGENOME (Thermo Scientific, USA) est également réalisée comme contrôle de l'efficacité et de la spécificité du siRNA d'intérêt. Après une première incubation de 5 min, les solutions A et B sont mélangées. La formation des complexes siRNA/agent de transfection nécessite alors une deuxième incubation de 20 min. Enfin, on rajoute un volume de 3,6 ml de milieu MEM complet. Les cellules sont alors rincées 1 fois avec 5 ml de PBS et incubées avec les siRNA pendant 24 h. Les siRNA dirigés contre Bnip3 ont été utilisés afin de déterminer la bande d'intérêt correspondant à Bnip3 en Western Blot (voir point 2.6).

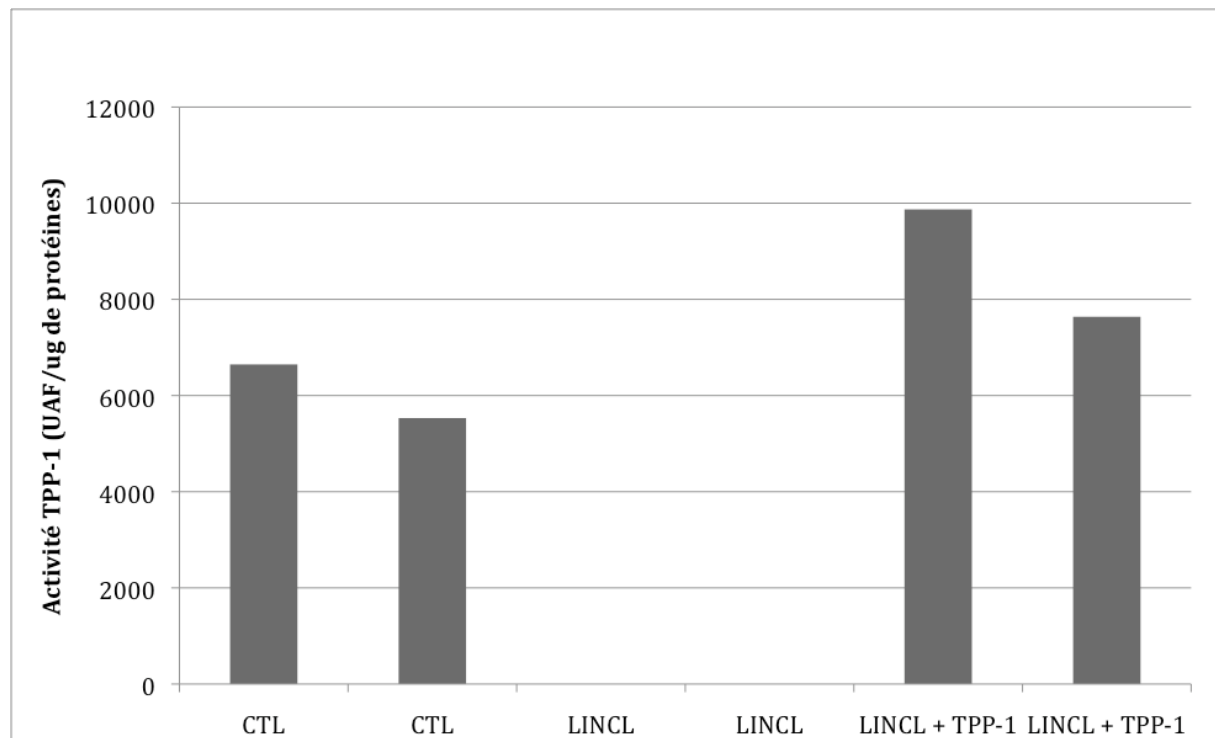


Figure 3.1 : Evaluation de la stabilité de l'activité enzymatique TPP-1 des fibroblastes LINCL ayant incorporé de la pro-enzyme TPP-1 recombinante

Les fibroblastes CTL et LINCL sont repiqués dans des boîtes de culture à T-75 cm² à une densité de 300 000 cellules par boîte. Le lendemain, dans certaines conditions, des cellules LINCL sont rincées avec 10 ml de PBS et 20 ml de milieu MEM complet contenant la pro-enzyme recombinante TPP-1 (3 nM) sont ajoutés pendant 48 h avant d'être rincées, et maintenues en culture pendant 5 jours supplémentaires dans du milieu MEM complet ne contenant plus d'enzyme (LINCL + TPP-1). Le dosage de l'activité enzymatique de la TPP-1 a ensuite été réalisé sur des lysats totaux de cellules CTL, LINCL et LINCL + TPP-1 en utilisant une mixture réactionnelle contenant un substrat spécifique de l'enzyme : Ala-Ala-Ala-Phe-AMC (1 mM). Après une incubation de 60 min à 37 °C la réaction est stoppée avec 1,2 ml de tampon Glycine/EDTA 50 mM (pH ; 10,5). L'intensité de fluorescence du produit de réaction est ensuite mesurée au spectrofluorimètre (λ Ex: 350 nm; λ Em: 460 nm). Les résultats sont exprimés en unités arbitraires de fluorescence (UAF) et normalisés par le contenu en protéines (n=2).

3 Résultats

A l'heure actuelle, les voies de signalisation et les mécanismes moléculaires affectés par une déficience en TPP-1 sont faiblement connus. La LINCL reste de ce fait peu caractérisée pour ses impacts sur la biologie cellulaire. Il a été montré que les LSDs peuvent affecter différentes dynamiques cellulaires comme provoquer une modification du trafic lipidique, modifier l'expression de gènes, ou encore altérer des fonctions d'autres organites dont la mitochondrie [42]. Etant donné l'importance de cet organite dans la biologie des cellules (production d'ATP, intégration des signaux de survie et de mort et maintien de l'homéostasie du calcium, notamment, voir introduction point 1.3.3), l'objectif principal de ce mémoire est donc d'analyser les effets éventuels d'une déficience en TPP-1 sur plusieurs caractéristiques de la population mitochondriale.

3.1 Vérification de la restauration de l'activité enzymatique de la TPP-1

Au cours de ce mémoire, deux lignées différentes de fibroblastes de peau humains ont été utilisées, à savoir les fibroblastes d'un individu sain et des fibroblastes d'une personne atteinte de la LINCL. Le problème d'un tel modèle cellulaire est la différence de « background » génétique retrouvée entre les deux lignées cellulaires. De ce fait, lors de l'interprétation des résultats, il peut s'avérer difficile de déterminer, avec certitude, si les différences observées entre ces deux lignées sont dues à la déficience de l'activité enzymatique de la TPP-1 ou sont le résultat de différences entre les génomes nucléaires.

Pour remédier à ce problème, l'activité enzymatique de la TPP-1 a été restaurée dans les cellules LINCL + TPP-1 au moyen d'une incubation en présence de la pro-enzyme TPP-1 recombinante produite dans les cellules CHO [168]. Cette pro-enzyme est ajoutée au milieu de culture à une concentration déterminée et est délivrée aux lysosomes par endocytose constitutive médiée par des récepteurs M6P [168]. L'activité enzymatique de la TPP-1 peut ensuite être dosée à l'aide d'un test basé sur le clivage d'un substrat spécifique de la TPP-1 (l'Ala-Ala-Ala-Phe-AMC). Le clivage de ce peptide assure la libération du groupement AMC fluorescent [169]. L'intensité de fluorescence mesurée au spectrophotomètre est donc directement proportionnelle à l'activité de la TPP-1.

Le dosage de l'activité de la TPP-1 a donc été réalisé dans des fibroblastes CTL, LINCL, et LINCL pré-incubées avec la pro-enzyme recombinante TPP-1 (3 nM) (LINCL +TPP-1) pendant 48 h. Afin de pouvoir estimer la stabilité de l'enzyme réintroduite au sein des cellules LINCL + TPP-1, le test d'activité enzymatique a été réalisé sur des cellules maintenues en culture pendant 5 jours supplémentaires (dans du milieu sans enzyme), c'est-à-dire au jour 7 à compter de l'addition de l'enzyme dans le milieu. Ce temps a également été choisi pour permettre la réversibilité éventuelle des changements observés dans les cellules LINCL suite à la réintroduction de l'enzyme.

Comme on peut l'observer à la **Figure 3.1**, alors que l'activité enzymatique de la TPP-1 est non détectée dans les cellules LINCL, une activité TPP-1 est bien récupérée dans les cellules LINCL pré-incubées avec la pro-enzyme TPP-1 recombinante. L'activité mesurée est comparable (et même légèrement supérieure) à celle observée dans des fibroblastes CTL. Etant donné que les fibroblastes LINCL incubés avec la pro-enzyme TPP-1 recombinante possèdent le même « background génétique » que les cellules LINCL, ils seront utilisés comme « bons contrôles » au cours de ce travail.

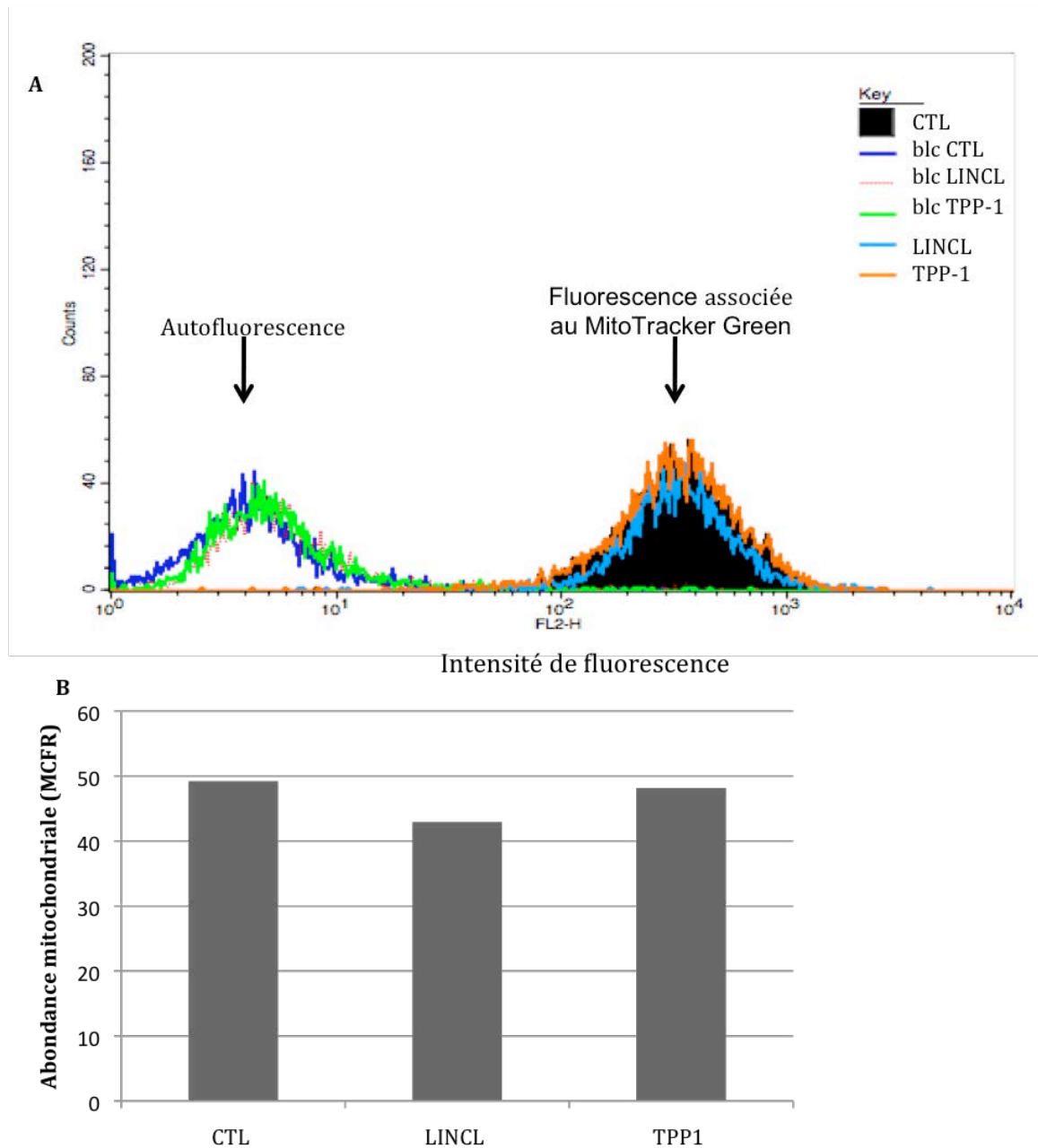


Figure 3.2 : Mesure de l'abondance de la population mitochondriale dans des fibroblastes CTL, LINCL et LINCL + TPP-1

A. Les fibroblastes CTL, LINCL et LINCL + TPP-1 sont repiqués dans des boîtes de culture à 6 puits à une densité de 40 000 cellules/puits. Au terme de 7 jours d'incubation (permettant la restauration de l'activité TPP-1 et la réversibilité éventuelle des modifications observées dans les cellules LINCL), les cellules sont rincées 1 x avec du PBS et sont détachées avec 1 ml de trypsine + EDTA 200 µg/ml puis sont resuspendues dans 2 ml de milieu MEM complet. Elles sont ensuite centrifugées pendant 10 min à 1000 rpm puis resuspendues dans du tampon KRH (Kreb's Ringer Buffer) + 0,5 % de BSA contenant la sonde MitoTracker Green à 100 nM. Les cellules incubent avec la sonde pendant 30 min à l'obscurité et à 37 °C. L'intensité de fluorescence des cellules est finalement mesurée par cytométrie de flux (λ ex. : 436 nm, λ ém. : 637 nm). Des blancs échantillons (sans sonde) sont également réalisés afin de déterminer l'autofluorescence des cellules.

B. Les résultats de quantification sont exprimés en MCFR (Mean Channel Fluorescent Ratio) (n=1).

3.2 *Mesure de l'abondance de la population mitochondriale dans les cellules CTL, LINCL et LINCL + TPP-1*

Comme expliqué dans l'introduction, plusieurs études ont montré que l'accumulation de macromolécules au sein des lysosomes affecte des voies de signalisation secondaires et altère différents processus cellulaires pouvant mener, *in fine*, à la mort cellulaire [42]. A l'heure actuelle, peu d'informations sont retrouvées dans la littérature sur les voies de signalisation et mécanismes cellulaires éventuellement affectés par une déficience en TPP-1. Ainsi, les effets potentiels de cette déficience enzymatique sur l'abondance, la morphologie et les fonctions mitochondriales sont peu caractérisés. Afin d'approfondir les connaissances en la matière, nous avons commencé par rechercher les effets éventuels de la déficience enzymatique sur la population mitochondriale. Comme expliqué dans l'introduction, l'abondance des mitochondries est régulée par des processus de biogenèse et de mitophagie, assurant un équilibre entre la biogenèse de nouvelles structures mitochondriales et la dégradation de mitochondries non fonctionnelles [20,70].

L'analyse de l'abondance mitochondriale a été réalisée sur des cellules CTL, LINCL et LINCL pré-incubées avec la pro-enzyme TPP-1 recombinante. Ce type d'expérience avait déjà été réalisé au laboratoire sur les cellules CTL et LINCL et les résultats obtenus suggéraient que l'abondance mitochondriale n'est pas différente entre ces deux lignées cellulaires (Stéphane Demine, Mémoire 2010). Cependant, dans ce travail, l'abondance de la population mitochondriale n'avait pas été analysée sur des cellules LINCL ayant récupéré une activité TPP-1. Le but de l'expérience décrite ci-dessous était donc de confirmer (ou d'infirmer) ces résultats, et d'étudier l'effet d'une pré-incubation des cellules LINCL en présence de la pro-enzyme TPP-1 sur l'abondance mitochondriale.

Des fibroblastes CTL, LINCL et LINCL + TPP-1 ont donc été marqués au moyen de la sonde MitoTracker Green (100 nM) qui marque spécifiquement les mitochondries et l'intensité de fluorescence a été mesurée en cytométrie de flux. Comme mentionné précédemment, cette sonde s'accumule spécifiquement dans la matrice mitochondriale et émet de la fluorescence après avoir réagi avec les groupements thiols présents sur les résidus cystéine des protéines mitochondriales. De plus, cette sonde s'accumule dans les mitochondries de manière indépendante du potentiel de membrane mitochondriale. Les mitochondries fonctionnelles ou présentant une dépolarisation sont donc également marquées [170].

Les résultats obtenus à la **Figure 3.2** montrent que l'abondance mitochondriale n'est pas modifiée dans les cellules LINCL par rapport aux cellules contrôles et que le traitement en présence de TPP-1 n'a pas d'effet sur l'abondance de l'organite. Ces résultats suggèrent que la déficience en TPP-1 n'affecte pas l'abondance de la population mitochondriale dans les cellules LINCL.

En conclusion, nous confirmons les résultats obtenus précédemment et nous pouvons dire que l'abondance mitochondriale, mesurée à l'aide de cette sonde, ne semble pas affectée par la déficience en TPP-1.

3.3 *Etude des effets de la déficience en TPP-1 sur la morphologie mitochondriale*

Les mitochondries sont des organites très dynamiques régulés par des événements fréquents de fusion et de fission mitochondriale. Comme mentionné dans l'introduction, le maintien de cette dynamique est essentiel à la réalisation de différentes fonctions par l'organite. Inversement, une dérégulation de ces mécanismes peut avoir de lourdes répercussions pour la cellule, comme une diminution de la production d'ATP, une altération de l'homéostasie calcique et, dans certaines conditions, une mort cellulaire anticipée [43,61]. Une étude réalisée préalablement au laboratoire indiquait que la morphologie des fibroblastes

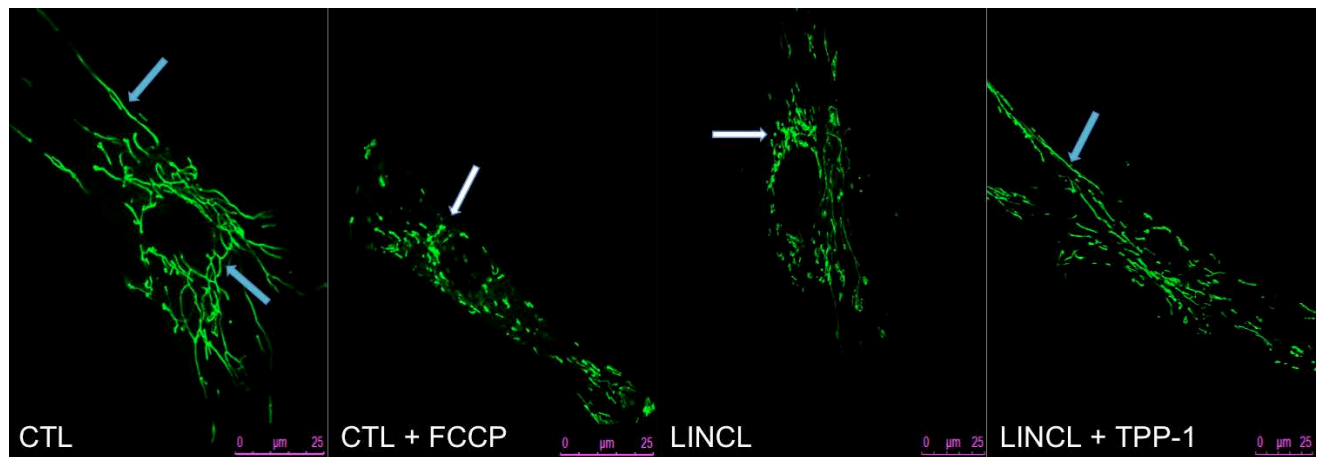
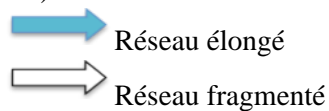


Figure 3.3 : Observation de la morphologie mitochondriale dans des fibroblastes CTL, LINCL et LINCL + TPP-1

Micrographie de la morphologie du réseau mitochondrial des cellules CTL, LINCL et LINCL + TPP-1 prise en microscopie confocale sur des cellules marquées au moyen de la sonde fluorescente MitoTracker Green. Des cellules CTL, LINCL et LINCL + TPP-1 ont étéensemencées dans des chambres Lab-Tek II à une densité de 10 000 cellules par chambre. Le lendemain, les cellules sont marquées avec la sonde fluorescente par une incubation de 40 min dans 1 ml de tampon KRH (Kreb's Ringer Buffer) + 2% de BSA, contenant la sonde MitoTracker Green à 100 nM. Un contrôle positif est également réalisé en incubant des cellules contrôles pendant 40 min en présence de l'agent découplant FCCP (p-triFluoromethoxy Carbonyl Cyanide Phenylhydrazone) à 20 μ M. Les cellules sont ensuite observées au microscope confocal pour l'acquisition de micrographies (λ exc : 490 nm et λ ém : 516 nm)



LINCL semblait être affectée (plus fragmentée) par la déficience en TPP-1 lorsqu'elle était comparée aux cellules CTL (Stéphane Demine, Mémoire 2010). Cependant, ces résultats, bien que potentiellement intéressants, ne reposaient pas sur une évaluation quantitative de la fragmentation. De plus, l'observation de la morphologie mitochondriale dans les cellules LINCL + TPP-1 n'avait pas été réalisée dans ce mémoire.

Afin de confirmer ou d'infirmer ces résultats en y apportant des arguments reposant sur une quantification objective, mais également d'analyser la morphologie du réseau mitochondrial des cellules LINCL pré-incubées avec la pro-enzyme TPP-1 recombinante, la morphologie mitochondriale des fibroblastes CTL, LINCL et LINCL + TPP-1 a été observée (**Figure 3.3**), puis quantifiée (**Figures 3.4 et 3.5**). Des cellules ont donc étéensemencées dans des chambres Lab-Tek II et marquées au moyen de la sonde fluorescente MitoTracker Green (100 nM), avant d'être observées en microscopie confocale. Afin d'obtenir des cellules dans lesquelles le réseau mitochondrial est fragmenté, un contrôle positif a été réalisé en incubant les cellules CTL pendant 40 min en présence de FCCP (carbonylcyanide-4-trifluorométhoxyphénylhydrazone) à 20 μ M, un agent découplant connu pour induire la fragmentation du réseau mitochondrial [43].

Comme observé à la **Figure 3.3**, la population mitochondriale des fibroblastes CTL présente un aspect réticulé, interconnecté, et largement branché, tandis que les cellules incubées en présence du FCCP présentent un aspect plus fragmenté de la morphologie mitochondriale. La morphologie du réseau mitochondrial des cellules LINCL montre également un aspect fragmenté, comparable à celui observé dans des cellules incubées en présence de FCCP. Cette observation suggère que la déficience en TPP-1 affecte la morphologie du réseau mitochondrial. Les cellules LINCL + TPP-1 présentent, quant à elles, un réseau mitochondrial plus allongé que celui observé pour des cellules LINCL.

Afin d'obtenir des données quantitatives sur la morphologie du réseau mitochondrial des cellules CTL, LINCL et LINCL + TPP-1, les réseaux mitochondriaux des micrographies obtenues en microscopie confocale ont été quantifiées à l'aide du logiciel ImageJ [171]. Ce logiciel est utilisé dans le but de mesurer l'Aspect Ratio (AR) du réseau mitochondrial, c'est-à-dire le rapport entre la longueur des fragments mitochondriaux (*l major*) et leur longueur axiale respective (*l minor*). Plus le réseau mitochondrial est fragmenté, plus la valeur AR est petite. Comme observé à la **Figure 3.4**, la valeur AR obtenue pour les cellules CTL est significativement plus élevée que les valeurs AR obtenues pour les cellules CTL incubées en présence de FCCP à 20 μ M et les cellules LINCL. Ces données indiquent que le réseau mitochondrial des cellules CTL incubées avec du FCCP et des cellules LINCL est fragmenté, comparé au réseau mitochondrial des cellules CTL. De manière intéressante, la valeur AR des cellules LINCL + TPP-1 est significativement plus élevée que celle obtenue pour la condition LINCL. Ce résultat indique que la restauration de l'activité enzymatique de la TPP-1 permet de restaurer, au moins partiellement, la morphologie du réseau mitochondrial.

Par ailleurs, le logiciel ImageJ permet de déterminer l'état d'embranchement et donc de réticulation du réseau mitochondrial en mesurant le rapport Ending Point/Branching Point (EP/BP). Ce rapport est calculé à partir du nombre d'extrémités libres (EB) et du nombre d'embranchements (BP) retrouvés dans le réseau mitochondrial. Plus le réseau mitochondrial est fragmenté, plus la valeur EP/BP est grande. Les résultats obtenus présentés à la **Figure 3.5** indiquent que les valeurs EP/BP des cellules LINCL et CTL + FCCP sont plus grandes que celles obtenues pour les conditions CTL et LINCL + TPP-1. Bien que ces résultats ne soient pas significatifs, ils vont dans le sens d'une plus grande fragmentation du réseau mitochondrial dans des cellules LINCL et suggèrent que la restauration de l'activité enzymatique de la TPP-1 permet de rétablir un réseau mitochondrial interconnecté et mieux branché chez ces mêmes cellules.

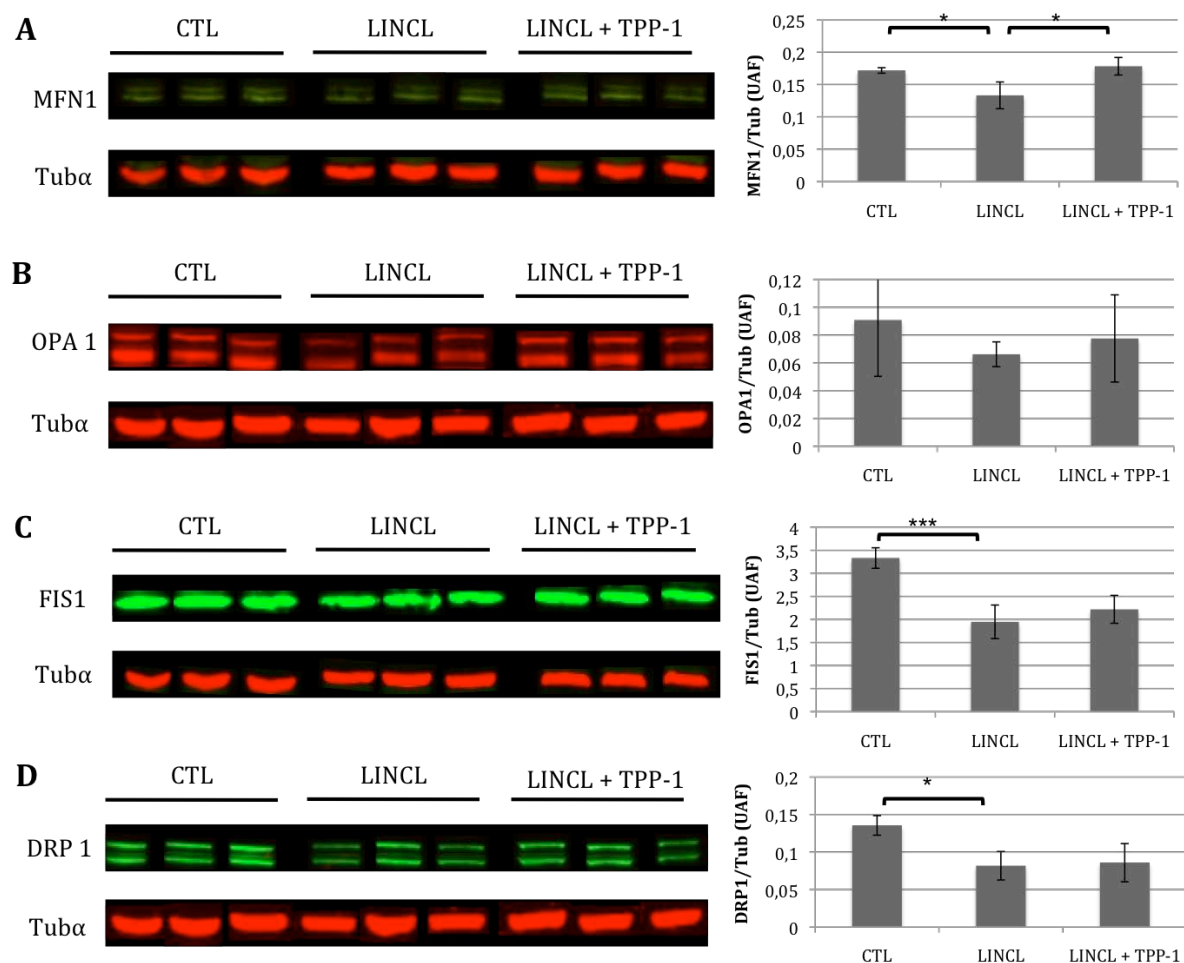


Figure 3.6 : Effet d'une déficience en TPP-1 sur l'abondance de protéines impliquées dans la régulation de la morphologie du réseau mitochondrial

Des fibroblastes CTL et LINCL sont ensemencés dans des boîtes de culture de 75 cm² à une densité de 300 000 cellules par boîte. Dans la condition LINCL + TPP-1, les cellules ont été incubées en présence de la pro-enzyme TPP-1 pendant 48 h puis maintenues en culture pendant 5 jours dans du milieu sans enzyme. Au terme de ces 7 jours, l'abondance des protéines MFN1 (A), OPA1 (B), FIS1 (C) et DRP1 (D) est ensuite déterminée en Western blot à fluorescence à partir de 20 µg de protéines préparés à partir de lysats totaux. La détection des protéines a été réalisée en utilisant des anticorps primaires monoclonaux IgG de souris anti-MFN1, anti-OPA1 et anti-DRP1, et un anticorps monoclonal de lapin anti-FIS1. Ces anticorps primaires ont ensuite été révélés par des anticorps secondaires anti-IgG de souris ou de lapin, couplés au fluorochrome IRDYE 800 nm. La quantité de protéines chargées a été vérifiée par l'immunodétection de l' α -tubuline. La quantification de l'intensité de fluorescence correspondante aux bandes d'intérêt est réalisée en utilisant le logiciel Odyssey. Les valeurs de fluorescence sont ensuite normalisées par l'intensité de fluorescence des signaux obtenus pour l' α -tubuline de la piste correspondant au signal d'intérêt. Les résultats normalisés sont exprimés en unités arbitraires de fluorescence (UAF), et représentent la moyenne \pm 1 écart-type (n=3). *, *** = significativement différent des fibroblastes LINCL avec respectivement p < 0,05 et p < 0,001, comme déterminé par un test t de Student non paillé.

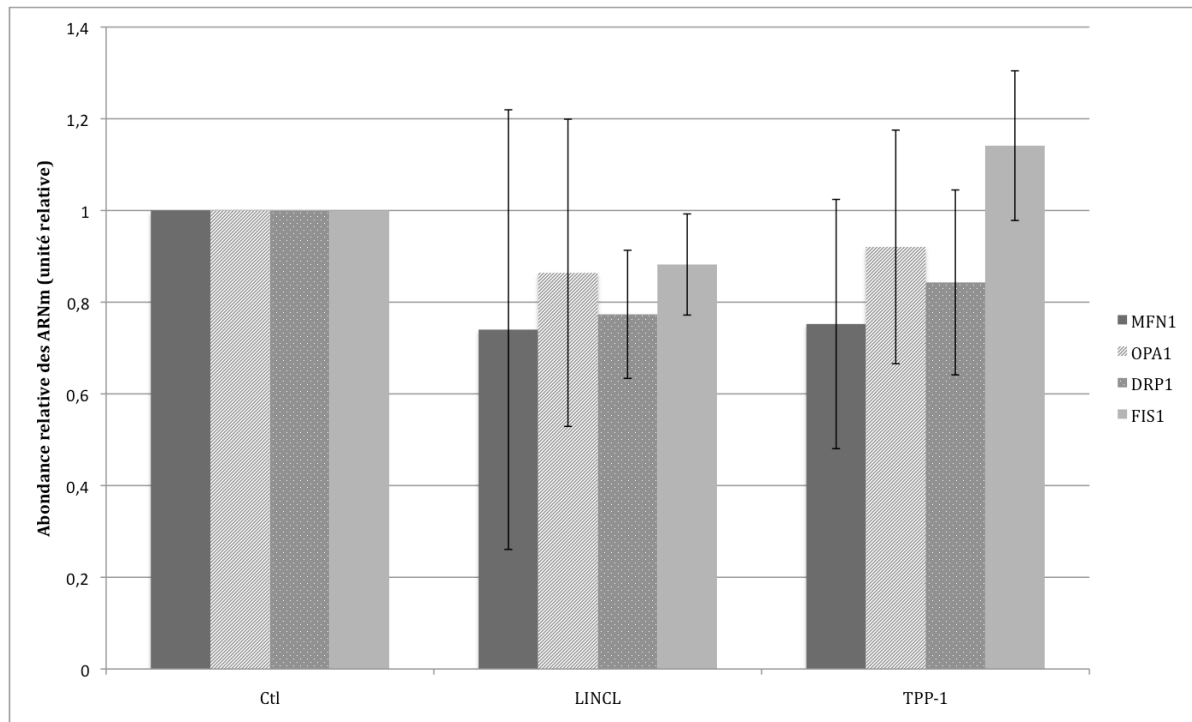


Figure 3.7 : Abondance relative des transcripts des gènes codant pour MFN1, OPA1, DRP1 et FIS1, dans les fibroblastes CTL, LINCL et LINCL + TPP-1

Des fibroblastes CTL et LINCL sont ensemencés dans des boîtes de culture de 75 cm² (T-75) à une densité de 150 000 cellules par boîte. Dans la condition LINCL + TPP-1, les cellules ont été incubées en présence de la pro-enzyme TPP-1 pendant 48 h puis maintenues en culture pendant 5 jours dans du milieu sans enzyme. Au terme de ces 7 jours, l'ARN total des cellules est extrait (1 µg) puis rétrotranscrit. Un volume de 5 µl d'ADNc est ensuite ajouté à une mixture réactionnelle PCR contenant les primers sens et anti-sens du transcrite d'intérêt ainsi que du SYBR Green pour réaliser la RT-qPCR en temps réel. L'abondance relative des transcripts MFN1, OPA1, DRP1 et FIS1 a été quantifiée selon la méthode $\Delta\Delta C_t$ normalisée par les valeurs d'abondance du transcrite du gène codant la GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase), utilisé comme gène de référence. Les résultats sont exprimés en abondance relative par rapport à l'abondance du transcrite présent dans les fibroblastes contrôles et représentent la moyenne \pm 1 écart-type (n=3).

Comme mentionné dans l'introduction (voir point 1.3.5), la morphologie dynamique du réseau mitochondrial est fortement régulée. Ainsi, dans le but de rechercher les mécanismes moléculaires qui conduiraient à une augmentation de la fragmentation de la morphologie mitochondriale dans les cellules présentant une déficience en TPP-1, nous avons étudié l'abondance des principales protéines connues pour réguler les événements de fusion-fission mitochondriale.

3.4 Effet d'une déficience en TPP-1 sur l'abondance de protéines impliquées dans la régulation des mécanismes de fusion/fission

La fragmentation du réseau mitochondrial peut être le résultat d'une diminution de la fusion mitochondriale ou d'une augmentation des phénomènes de fission. A ce jour, 5 protéines principales sont connues pour être impliquées dans la régulation des phénomènes de fusion et de fission : les protéines MFN1, MFN2 et OPA1 qui sont impliquées dans la fusion mitochondriale, et DRP1 et FIS1 qui régulent et contrôlent les événements de fission [65,183]. Dans le but d'étudier les effets éventuels d'une déficience en TPP-1 sur l'abondance de ces acteurs moléculaires impliqués dans le contrôle et la régulation de la dynamique de la morphologie mitochondriale des cellules LINCL, l'abondance des protéines MFN1, OPA1, DRP1 et FIS1 a été analysée et quantifiée en Western blot à fluorescence sur des lysats totaux de fibroblastes CTL, LINCL et LINCL + TPP-1.

Les résultats obtenus sont présentés à la **Figure 3.6**. Nous pouvons observer que l'abondance des protéines impliquées dans la fusion/fission (MFN1, OPA1, DRP1 et FIS1) est systématiquement plus importante dans les cellules CTL comparées aux cellules LINCL. Rappelons que ces différences pourraient résulter de la différence des « background génétique » entre les deux lignées cellulaires. Par contre, de manière intéressante, il semblerait que la déficience en TPP-1 ait un effet sur l'abondance de la protéine MFN1, étant donné que la pré-incubation des cellules LINCL en présence de la pro-enzyme TPP-1 conduit à une augmentation statistiquement significative de l'abondance de cette mitofusine. Une légère augmentation (mais non significative dans nos conditions expérimentales) de l'abondance de la protéine OPA1 est également observée (**Figure 3.6**). Par contre, la déficience en TPP-1 n'a que peu ou pas d'effet sur l'abondance des protéines FIS1 et DRP1. Ces résultats suggèrent que les mécanismes de fusion mitochondriale pourraient être affectés par la déficience enzymatique en TPP-1 dans les cellules LINCL. Ajoutons encore que l'abondance de la MFN2 n'a pas été étudiée dans ce travail alors que cette protéine participe également aux événements de fusion mitochondriale [65,183].

Une étude récente portant sur la dynamique des mitochondries et la neurodégénérescence a montré que les mitochondries de cellules MEFs déficientes en MFN1 présentent une morphologie plus fragmentée, révélant ainsi le rôle de cette mitofusine dans la régulation de la morphologie mitochondriale [184]. Une diminution de l'abondance de la MFN1 a également été retrouvée dans des cellules de Purkinje de souris *Harlequin* possédant une mutation au niveau du gène *aif* (Apoptosis Inducing Factor) et caractérisée par une dégénération progressive des neurones du cervelet et de la rétine [185].

Afin de voir si la modification de l'abondance de MFN1 est également observée au niveau transcriptionnel, l'abondance des transcrits MFN1, OPA1, DRP1 et FIS1 ont été analysés par RT-qPCR en temps réel.

Les résultats obtenus à la **Figure 3.7** indiquent que l'abondance des transcrits n'est pas (ou peu) modifiée dans les cellules LINCL. Ce résultat suggère que les modifications d'abondance des protéines MFN1 et OPA1 observées précédemment pourraient résulter d'un contrôle différentiel sur la traduction des ARNm ou de modifications post-traductionnelles (affectant éventuellement le temps de demi-vie de ces protéines) [186] mais ne semblent pas être causées par des changements dans l'abondance des transcrits codant pour ces protéines.

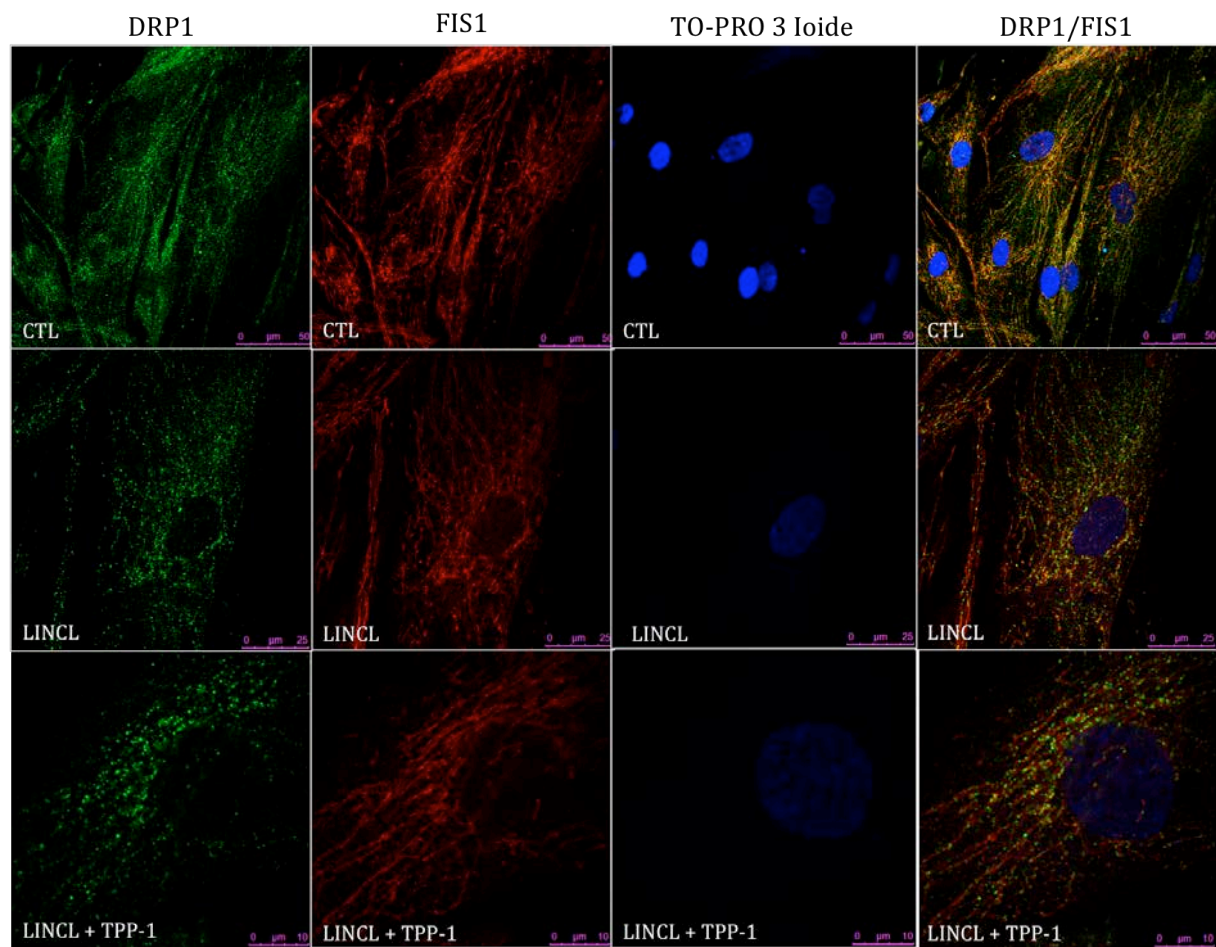


Figure 3.8 : Effet d'une déficience en TPP-1 sur le recrutement de la protéine DRP1 en membrane mitochondriale externe

Des fibroblastes CTL et LINCL sontensemencés à une densité de 4 000 cellules/puits sur des lamelles couvre-objets préalablement déposées dans une boîte de culture à 24 puits. Dans la condition LINCL + TPP-1, les cellules ont été incubées en présence de la pro-enzyme TPP-1 pendant 48 h puis maintenues en culture pendant 5 jours dans du milieu sans enzyme. Au terme de ces 7 jours, les cellules sont rincées 3 x avec du PBS puis fixées pendant 10 min avec 500 µl de PFA à 4 %. Les cellules sont ensuite perméabilisées pendant 5 min au moyen de PBS + Triton X-100 à 1 % et incubées à 4 °C en présence des anticorps primaires IgG de souris anti-DRP1 et IgG de lapin anti-FIS1 pendant 16 h. Les cellules sont rincées à l'aide de PBS-BSA à 1 %, incubées pendant 1 h à l'obscurité en présence des anticorps secondaire anti-IgG de souris Alexa Fluor 488 (DRP-1) et anti-IgG de lapin Alexa Fluor 647 (FIS1). Un marquage de 35 min au TO-PRO 3 est également réalisé pour marquer les noyaux cellulaires (bleu). Les lamelles couvre-objets sont finalement montées sur des lames porte-objets à l'aide d'une goutte de Mowiol et analysées au microscope confocal.

Signal vert : λ exc : 490 nm et λ ém : 535 nm, signal rouge : λ exc : 650 nm et λ ém : 750 nm, signal bleu λ exc : 640 nm et λ ém : 660 nm

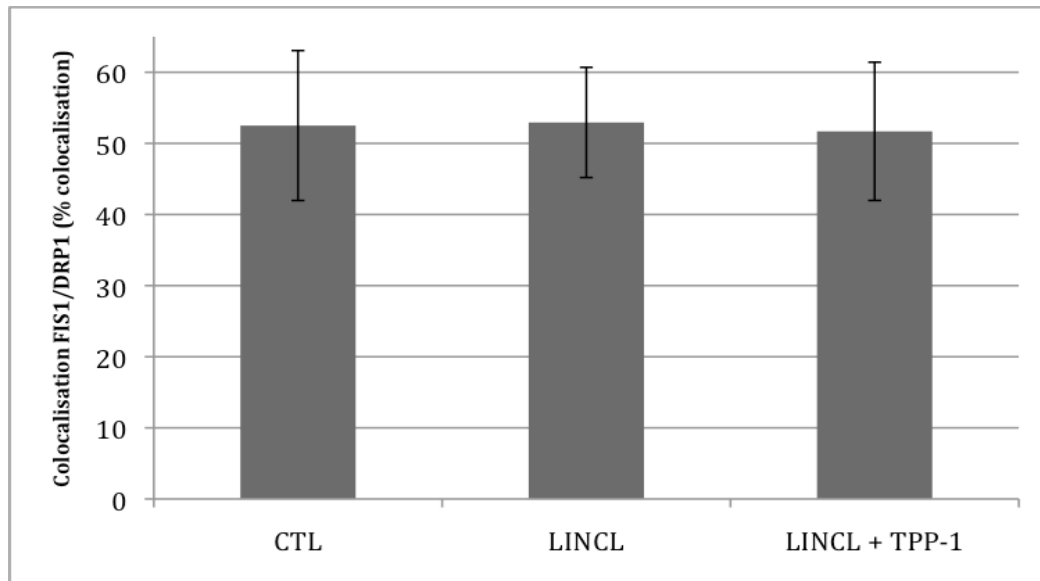


Figure 3.9 : Effet d'une déficience en TPP-1 sur le recrutement de la protéine DRP1 en membrane mitochondriale (quantification)

Des fibroblastes CTL et LINCL sontensemencés à une densité de 4 000 cellules/puits sur des lamelles couvre-objets préalablement déposées dans une boîte de culture à 24 puits. Dans la condition LINCL + TPP-1, les cellules ont été incubées en présence de la pro-enzyme TPP-1 pendant 48 h puis maintenues en culture pendant 5 jours dans du milieu sans enzyme. Au terme de ces 7 jours, les cellules sont rincées 3 x avec du PBS puis fixées pendant 10 min avec 500 µl de PFA à 4 %. Les cellules sont ensuite perméabilisées pendant 5 min au moyen de PBS + Triton X-100 à 1 % et incubées à 4 °C en présence des anticorps primaires IgG de souris anti-DRP1 et IgG de lapin anti-FIS1 pendant 16 h. Les cellules sont rincées à l'aide de PBS-BSA à 1 %, incubées pendant 1 h à l'obscurité en présence des anticorps secondaire anti-IgG de souris Alexa Fluor 488 (DRP-1) et anti-IgG de lapin Alexa Fluor 647 (FIS1). Un marquage de 35 min au TO-PRO 3 est également réalisé pour marquer les noyaux cellulaires (bleu). Les lamelles couvre-objets sont finalement montées sur des lames porte-objets à l'aide d'une goutte de Mowiol et analysées au microscope confocal.

Les micrographies obtenues au microscope confocal ont ensuite analysées à l'aide du logiciel Leica LAS AF. Ce logiciel permet de déterminer le pourcentage de co-localisation entre deux protéines dans une zone pré-définie en se basant sur une quantification de pixels et l'établissement de ratios. On détermine ainsi un rapport entre les pixels « vert », les pixels « rouge » et les pixels « orange/jaune » (Leica). Les résultats sont présentés en pourcentages de co-localisation et représentent la moyenne \pm 1 écart-type pour 10 cellules à raison de 2 zones/cellule (n=20 analyses).

En effet, comme mentionné dans l'introduction, ces protéines sont fortement régulées par des modifications post-traductionnelles [186].

Il est donc possible que la déficience en TPP-1 dans les cellules LINCL conduise à une modification post-traductionnelle de la protéine MFN1. En effet, il a été mis en évidence que l'ubiquitine ligase MARCH-V assure l'ubiquitination de la MFN1 et facilite ainsi sa dégradation par la voie du protéasome [187]. Une altération des mécanismes impliqués dans la régulation post-traductionnelle de la MFN1 pourrait donc peut-être expliquer la diminution de l'abondance observée dans les cellules LINCL, et partiellement réversible lors de la restauration de l'activité TPP-1 pendant 7 jours.

3.5 Effet d'une déficience en TPP-1 sur le recrutement de la protéine DRP1 en membrane mitochondriale externe

La fragmentation du réseau mitochondrial peut être le résultat d'une augmentation de la fission mitochondriale. Cette dernière est principalement régulée par les protéines FIS1, une protéine résidente de la mitochondrie localisée en MME et DRP1, une GTPase cytosolique.

Rappelons que lors de l'initiation de la fission, FIS1 recrute DRP1 en MME, qui va ensuite s'oligomériser autour du fragment mitochondrial à isoler en formant un anneau de constriction [154]. Nous venons de montrer que l'abondance des protéines DRP1 et FIS1 n'est pas modifiée dans les cellules LINCL par rapport aux cellules LINCL + TPP-1. Mais un changement de localisation et un recrutement différentiel pourrait aussi conduire à une fragmentation du réseau mitochondrial dans les cellules LINCL et ce, sans modification de l'abondance totale des protéines de fission. Ce recrutement de DRP1 par FIS1 en MME est également régulé par des modifications post-traductionnelles. Par exemple, lors de l'induction de l'apoptose, la protéine DDP/TIMM8 α est libérée dans le cytosol où elle interagit avec le domaine C-terminal de DRP1 afin de faciliter son recrutement en MME [157]. De même, la protéine DRP1 peut être phosphorylée par la CaMKI α au niveau de la Ser600, afin de faciliter son recrutement en MME [159]. Enfin, il est connu que l'ubiquitine ligase MARCH-V favorise quant à elle la fission mitochondriale en recrutant DRP1 en MME par ubiquitination de cette protéine [158].

Dans le but d'étudier l'impact éventuel d'une déficience en TPP-1 sur le recrutement de la protéine DRP1 par FIS1 en MME, des cellules CTL, LINCL et LINCL + TPP-1 ont été marquées en immunofluorescence avec des anticorps dirigés contre FIS1 et DRP1 avant d'être observées au microscope confocal. Les micrographies obtenues en microscopie confocale sont présentées à la **Figure 3.8** et les signaux de fluorescence de co-localisation ont ensuite été quantifiés à l'aide du logiciel Leica LAS AF (**Figure 3.9**). Les résultats obtenus suggèrent que la protéine DRP1 est recrutée en MME de manière comparable dans les cellules CTL, LINCL et LINCL + TPP-1. Ainsi, la déficience enzymatique de la TPP-1 n'affecte apparemment pas le recrutement de la protéine DRP1 en MME, suggérant que d'autres mécanismes (comme la diminution de l'abondance de la MFN1) sont impliqués dans la fragmentation du réseau mitochondrial observée dans des cellules LINCL.

Il est cependant important de signaler que la quantification réalisée à l'aide de ce logiciel est assez arbitraire étant donné qu'elle ne se réalise pas sur des cellules entières. L'expérimentateur sélectionne les zones qu'il souhaite quantifier. Afin d'assurer une certaine représentativité de la quantification, un nombre défini de zones (2) de taille égale ont été analysées pour chacune des cellules (10 cellules/condition). Ainsi, la quantification ne peut être présentée qu'à titre indicatif.

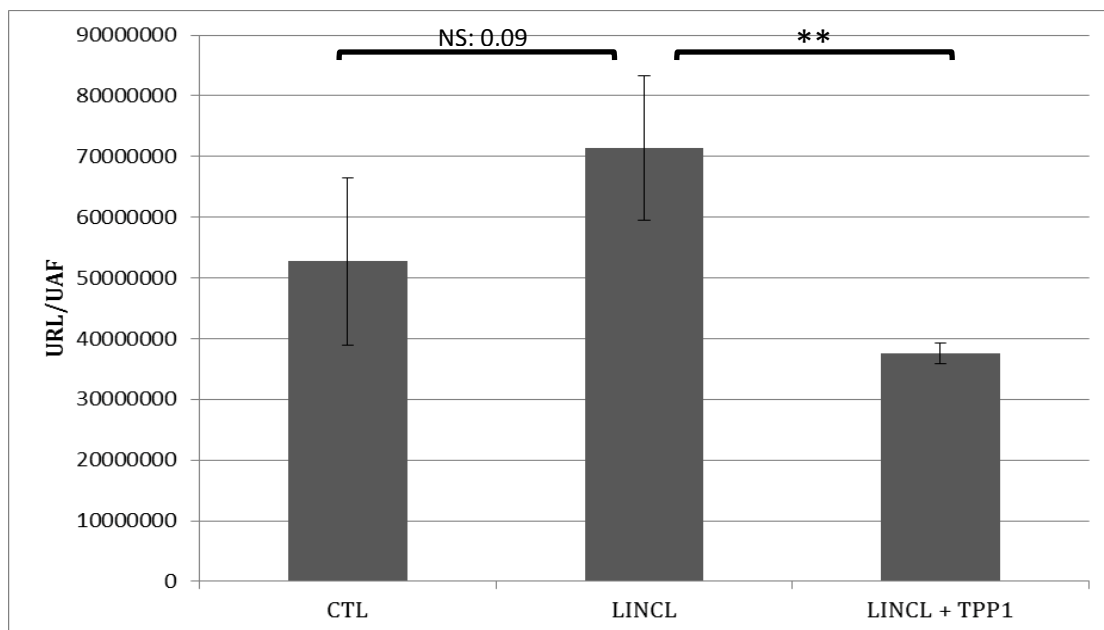


Figure 3.10 : Dosage du contenu intracellulaire en ATP dans les cellules CTL, LINCL et LINCL + TPP-1

Des fibroblastes CTL et LINCL sontensemencés dans des boîtes de culture à 6 puits à une densité de 40 000 cellules par puits. Dans la condition LINCL + TPP-1, les cellules ont été incubées en présence de la pro-enzyme TPP-1 pendant 48 h puis maintenues en culture pendant 5 jours dans du milieu sans enzyme. Au terme de ces 7 jours, les cellules sont rincées 1 x avec du HBSS et sont incubées pendant 10 s en présence de 500 µl de la solution « ATP releasing agent ». Le surnageant est transféré dans des microtubes et rapidement congelés à -70 °C. Au moment du dosage, ils sont dilués 2 x dans la solution ATP releasing agent. Un volume de 100 µl de cette solution est prélevé et ajouté à 100 µl d'une mixture réactionnelle. Cette dernière permet de mesurer le contenu en ATP par une réaction enzymatique catalysée par la luciférase et basée sur la réaction d'oxydation de la luciférine en oxyluciférine (en présence d'O₂, de Mg²⁺, et d'ATP). La lecture de la luminescence est réalisée directement au luminomètre. Les données sont exprimées en unités relatives de luminescence (URL) normalisées par la fluorescence (UAF) mesurée après marquage de l'ADN (à l'iodure de propidium) des tapis cellulaires correspondants (URL/UAF). Les résultats représentent la moyenne ± 1 écart-type (n=3). ** = significativement différent des fibroblastes LINCL avec p < 0,01, comme déterminé par un test t de Student non pairé. NS = non significativement différent des fibroblastes CTL.

3.6 Effet d'une déficience en TPP-1 sur le contenu intracellulaire en ATP

Nous nous sommes ensuite intéressés aux effets potentiels d'une déficience en TPP-1 sur différentes fonctions mitochondriales. Une des fonctions principales des mitochondries est la production d'ATP au moyen de la phosphorylation oxydative. Il est donc intéressant de s'attarder sur le contenu en ATP dans les cellules et de chercher à savoir si ce contenu en ATP est affecté par la déficience en TPP-1 dans les cellules LINCL. Des résultats obtenus préalablement au laboratoire indiquaient que le contenu intracellulaire en ATP était légèrement augmenté dans les cellules LINCL, bien que la différence n'était pas statistiquement significative par rapport aux cellules contrôles (Stéphane Demine, Mémoire 2010).

Afin de confirmer ces résultats, mais également d'étudier l'effet de la restauration de l'activité enzymatique TPP-1 sur le contenu intracellulaire en ATP dans des cellules LINCL, les cellules CTL, LINCL et LINCL + TPP-1 ont été incubées en présence d'une solution « ATP releasing agent », permettant la sortie de l'ATP dans le milieu extracellulaire. Le contenu en ATP a ensuite été dosé au moyen d'une réaction enzymatique catalysée par la luciférase en présence d'O₂ et de Mg²⁺, induisant l'oxydation de la luciférine en oxiluciférine accompagnée d'une production de lumière (photons). Le nombre de photons émis et donc l'intensité de la luminescence est finalement mesurée au luminomètre.

Les résultats obtenus à la **Figure 3.10** montrent que le contenu intracellulaire en ATP est plus élevé dans les cellules LINCL que dans des cellules CTL (même si cette différence est non significative dans nos conditions expérimentales), confirmant ainsi les résultats obtenus précédemment au laboratoire. De manière intéressante, nous constatons également que la pré-incubation des cellules LINCL en présence de la pro-enzyme TPP-1 recombinante diminue significativement le contenu intracellulaire en ATP, suggérant que la déficience en TPP-1 serait responsable de (associée à) une augmentation du contenu en ATP, qui peut être corrigée suite à la restauration d'une activité TPP-1 dans les cellules pendant plusieurs jours.

Ces résultats sont assez surprenants étant donné que les données dans la littérature indiquent qu'une fragmentation du réseau mitochondrial s'accompagne souvent d'une diminution de la production d'ATP [188]. La fragmentation du réseau mitochondrial préalablement quantifiée dans les cellules LINCL et corrigée, au moins partiellement lors de la restauration de l'activité TPP-1 nous laissait penser que ces mitochondries pourraient avoir une capacité réduite à produire de l'ATP. Ceci-dit, bien que surprenants, ces résultats pourraient s'interpréter de différentes manières. Il est effectivement possible que les mitochondries des cellules LINCL produisent moins d'ATP que les mitochondries CTL et LINCL + TPP-1, mais que le contenu total en ATP soit plus élevé en réponse à une activation de la glycolyse. Il est également possible que la consommation/utilisation de l'ATP par les cellules soit diminuée. En effet, dans la hiérarchie de l'utilisation de l'ATP par une cellule, il est établi que celui-ci est principalement consommé par la synthèse de l'ADN, de l'ARN, des acides gras et des protéines, ainsi que par les Na⁺/K⁺ - ATPases et Ca²⁺-ATPases [189]. Un ralentissement de l'un (ou plusieurs) de ces processus pourrait ainsi mener à une diminution de la consommation d'ATP par les cellules LINCL.

3.7 Effet d'une déficience en TPP-1 sur le potentiel de membrane mitochondriale

Le potentiel de membrane mitochondriale, qui est généré par la chaîne de transport des électrons, est essentiel à la production d'ATP ainsi qu'à l'importation de protéines mitochondriales [190]. Inversement, une diminution du potentiel de membrane s'accompagne d'une fragmentation du réseau mitochondrial et est connue pour induire la mort cellulaire par apoptose suite à la libération du cytochrome c dans le cytosol [191]. Il est intéressant de souligner qu'une diminution du potentiel de membrane mitochondriale est impliquée dans la

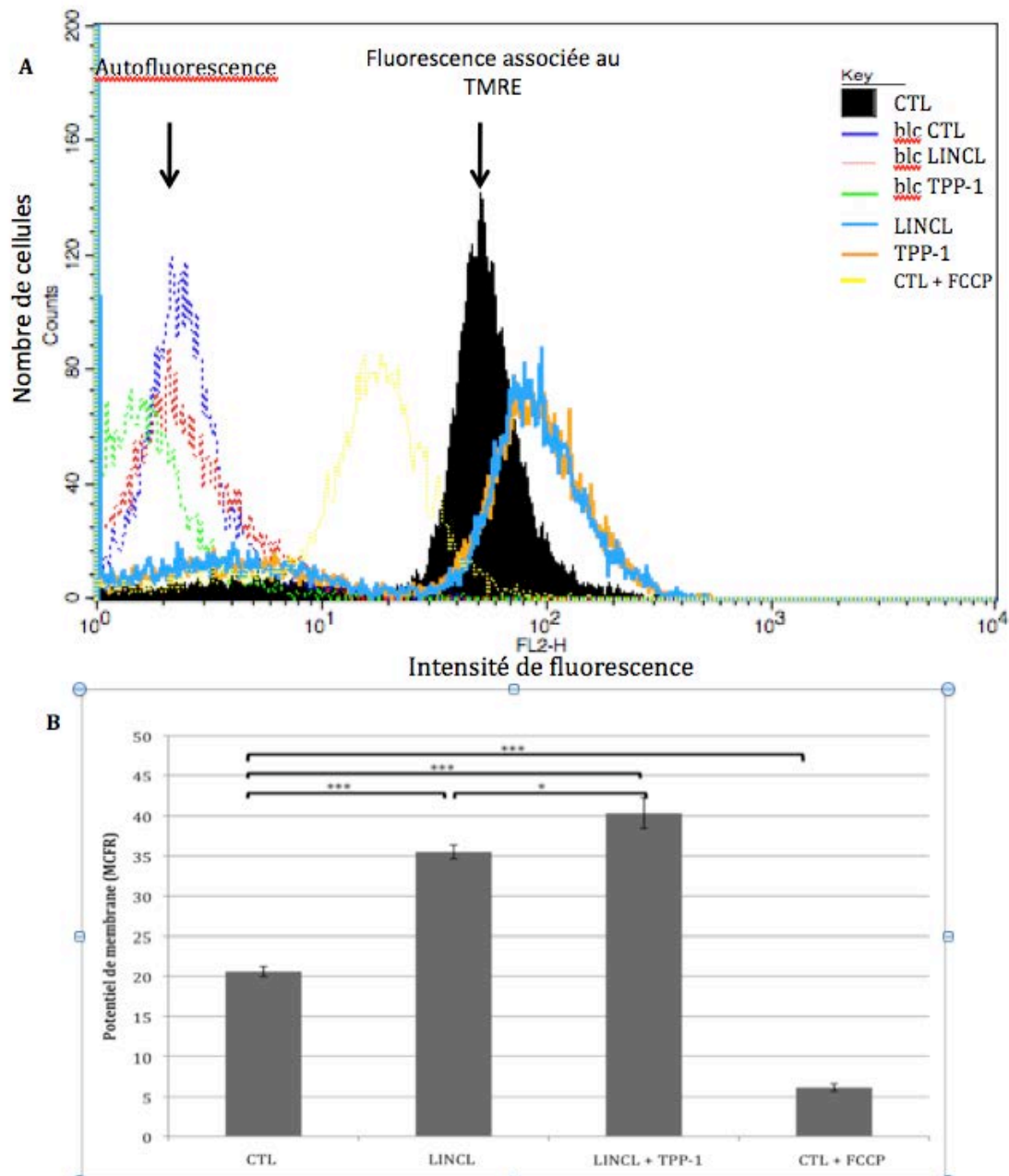


Figure 3.11 : Effet d'une déficience en TPP-1 sur le potentiel de membrane des mitochondriale

A. Des fibroblastes CTL et LINCL sont ensemencés dans des boîtes de culture à 6 puits à une densité de 40 000 cellules par puits. Dans la condition LINCL + TPP-1, les cellules ont été incubées en présence de la pro-enzyme TPP-1 pendant 48 h puis maintenues en culture pendant 5 jours dans du milieu sans enzyme. Au terme de ces 7 jours, les cellules sont rincées 1x avec du PBS stérile et incubées pendant 30 min (à 37 °C et à l'obscurité) en présence de la sonde TMRE à 25 nM diluée dans du milieu MEM complet. Les cellules sont alors rincées avec du PBS stérile puis détachées au moyen de trypsine + EDTA à 200 µg/ml. Les cellules sont centrifugées pendant 5 min à 1 000 rpm et sont resuspendues dans 500 µl de tampon HEPES. L'intensité de fluorescence est mesurée en cytométrie de flux (λ exc. : 436 nm, λ ém. : 637 nm).

Des blancs échantillons (sans sonde) sont réalisés afin de déterminer l'autofluorescence des cellules. Enfin, un contrôle positif est réalisé en ajoutant du FCCP à 20 µM pendant 1 min avant la mesure de la fluorescence en cytométrie de flux.

B. Les résultats sont exprimés en MCFR (Mean Channel Fluorescent Ratio) et représentent la moyenne \pm 1 écart-type (n=3). *, *** = significativement différent des fibroblastes CTL ou LINCL avec, respectivement, $p < 0,05$ et $p < 0,001$, comme déterminé par un test t de Student non païré.

pathogénèse de différentes LSDs [192]. Par exemple, au niveau des astrocytes de souris β -gal^{-/-} (modèle de la Gangliosidose à GM1) on observe une fragmentation du réseau mitochondrial, conduisant à une diminution du potentiel de membrane et à une sensibilité accrue aux stress oxydatifs [193].

Etant donné l'importance d'un changement du potentiel de membrane mitochondriale dans différentes pathologies, et au vu de l'augmentation du contenu en ATP dans les cellules LINCL, il était donc intéressant d'étudier l'impact éventuel d'une déficience en TPP-1 sur le potentiel de membrane mitochondriale.

Pour ce faire, des cellules CTL, LINCL et LINCL + TPP-1 ont été marquées à l'aide de la sonde TMRE, une sonde permettant de marquer spécifiquement les mitochondries en fonction de leur potentiel de membrane [194]. Un contrôle positif a également été réalisé en incubant des cellules contrôles avec du FCCP à 20 μ M, un agent découplant connu pour induire une diminution du potentiel de membrane [133]. L'intensité de fluorescence a finalement été mesurée en cytométrie de flux.

Les résultats obtenus et présentés à la **Figure 3.11** montrent une différence de potentiel de membrane mitochondriale entre les cellules contrôles CTL et LINCL, allant dans le sens d'un potentiel de membrane plus élevé dans les cellules LINCL. Cette différence peut être liée à des différences entre les lignées cellulaires. En effet, ce résultat particulier pourrait simplement s'expliquer par le fait que la sonde TMRE n'est pas une sonde ratiométrique. Ainsi, l'intensité de fluorescence mesurée est aussi dépendante de l'accumulation de la sonde dans les mitochondries. Il est ainsi possible que le chargement en sonde soit différent entre les deux lignées cellulaires, interférant ainsi avec les résultats obtenus. Cependant, les résultats obtenus suggèrent que la restauration de l'activité enzymatique de la TPP-1 dans les cellules LINCL provoque une augmentation du potentiel de membrane. Ceci indique que le potentiel de membrane semble affecté par la déficience enzymatique de la TPP-1 dans les cellules LINCL et pourrait être corrélé à la fragmentation du réseau mitochondrial observée. En effet, rappelons qu'une augmentation de la fusion semble observée dans les cellules LINCL + TPP-1 (**Figure 3.6**) et qu'il est connu qu'un potentiel de membrane mitochondriale élevé favorise la fusion mitochondriale [195].

Si cette différence n'est pas artéfactuelle, il est intéressant de nous arrêter un instant sur les raisons biologiques susceptibles de conduire à l'hyperpolarisation de la membrane mitochondriale. Bien que la dépolarisation des mitochondries soit associée à l'apoptose (libération du cytochrome *c* [191]), l'hyperpolarisation de la membrane mitochondriale peut également mener à l'induction de l'apoptose. Par exemple, une étude portant sur les modifications de l'organisation du réseau de microtubules de cellules H460 lors de l'initiation de l'apoptose a montré que l'organisation des microtubules dans les cellules apoptotiques est dépendante de fortes concentrations en ATP et de l'hyperpolarisation des mitochondries [196].

Il a également été rapporté dans des myoblastes H9c2 de rats que la condition d'hyperglycémie (caractéristique du diabète et de l'obésité) induit une augmentation de la production de pyruvate, suivie d'une hyperpolarisation de la membrane mitochondriale et de la surproduction de ROS en réponse à une augmentation de l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale. Cette étude a également montré que la fragmentation du réseau mitochondrial est essentielle à la prise de pyruvate par les cellules H9c2 ainsi qu'à l'hyperpolarisation de la membrane et la production de ROS. Bien que les causes de cette fragmentation n'aient pas été déterminées, il semblerait que la fragmentation du réseau mitochondrial ait pour but d'augmenter la surface occupée par les mitochondries et de favoriser leur accessibilité au substrat (pyruvate) [197].

Bien que nous soyons rassurés sur le fait que nous mesurons bien un potentiel de membrane en présence de la sonde TMRE en raison de l'importante diminution de

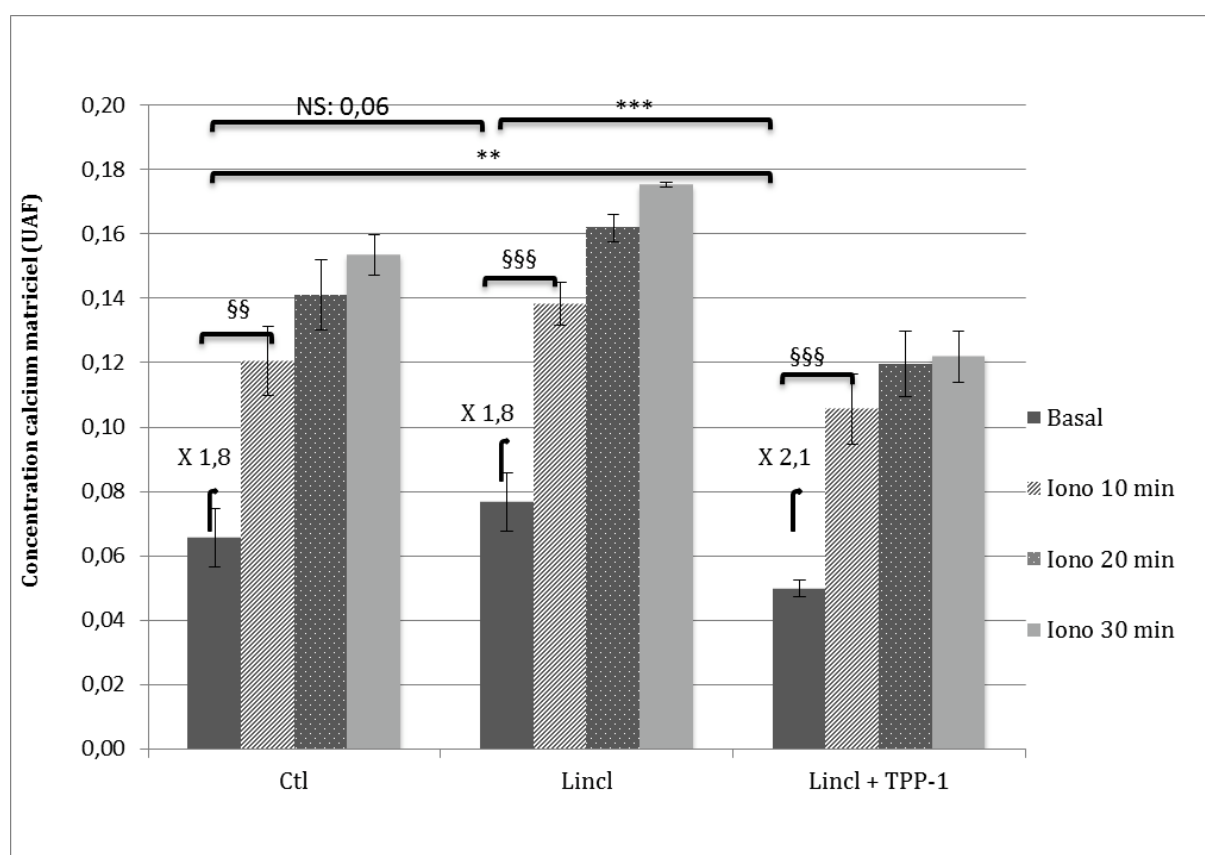


Figure 3.12 : Effet d'une déficience en TPP-1 sur la concentration en calcium matriciel mitochondrial en condition basale et en réponse à une stimulation par l'ionomycine

Des fibroblastes CTL et LINCL sont ensemencés dans des boîtes de culture à 24 puits à une densité de 9 000 cellules par puits. Dans la condition LINCL + TPP-1, les cellules ont été incubées en présence de la pro-enzyme TPP-1 pendant 48 h puis maintenues en culture pendant 5 jours dans du milieu sans enzyme. Au terme de ces 7 jours, les cellules sont rincées 2 x avec du HBSS (Hanks Balanced Salt Solution) puis incubées pendant 30 min à l'obscurité en présence de 500 µl de tampon HBSS/CaCl₂ (1 mM) contenant la sonde X-Rhod 5F à 2 µM. Afin de mesurer la concentration en calcium matriciel mitochondrial à l'état basal, les cellules sont rincées 3 x avec de l'HBSS/ CaCl₂ (1 mM) et l'intensité de fluorescence est mesurée au spectrofluorimètre (λ ex: 580 nm; λ ém: 612 nm). Ensuite, 500 µl de tampon HBSS/CaCl₂ (1 mM) contenant de l'ionomycine à 10 µM sont ajoutés dans les puits (sauf les blancs) et une mesure de l'intensité de fluorescence est réalisée toutes les 10 min, pendant 30 min. Les résultats sont normalisés par le nombre de cellules des tapis cellulaires déterminé à partir d'un marquage de l'ADN à l'iodure de propidium (λ ex: 518 nm; λ ém: 612 nm). Les résultats sont exprimés en unités arbitraires de fluorescence (UAF) et représentent la moyenne ± 1 écart-type (n=3). **, *** = significativement différent de la concentration du calcium matriciel à l'état basal des fibroblastes CTL ou LINCL avec, respectivement, p < 0,01 et p < 0,001 comme déterminé par un test t de Student non pairé. §§, §§§ = significativement différent de la concentration matricielle basale correspondante, avec, respectivement, p < 0,01 et p < 0,001 comme déterminé par un test t de Student non pairé.

fluorescence mesurée dans les cellules contrôles incubées en présence de FCCP (**Figure 3.11**), les résultats devront être confirmés en utilisant une sonde ratiométrique, telle que la sonde JC-1. Celle-ci s'accumule spécifiquement sous forme monomérique dans les mitochondries dépolarisées et émet un signal de fluorescence vert. L'hyperpolarisation de la membrane induit une agrégation de la sonde JC-1 avec un déplacement de la fluorescence vers le rouge. Le rapport entre ces deux signaux de fluorescence permet donc de déterminer le potentiel de membrane mitochondriale global des cellules [198].

3.8 Effet de la déficience en TPP-1 sur la concentration en calcium matriciel mitochondriale en condition basale, et la capacité des mitochondries des cellules à tamponner une augmentation de la concentration calcique cytosolique

Comme mentionné dans l'introduction, le calcium cytosolique est impliqué dans la régulation de différents mécanismes cellulaires tels que la prolifération cellulaire, l'expression de gènes, l'activation d'enzymes, et la libération de neurotransmetteurs par des canaux voltage-dépendants dans les cellules neurales [56,57,95]. Cependant, une augmentation de la concentration cytosolique en calcium libre peut également induire l'activation de mécanismes de mort cellulaire suite à l'activation d'enzymes hydrolytiques dépendantes du calcium, telles que les calpaïnes [96]. Pour éviter ce phénomène, les mitochondries sont capables de tamponner une augmentation de la concentration cytosolique en calcium libre. Ceci-dit, une concentration calcique trop élevée au sein de la matrice mitochondriale peut également mener à l'activation de la mort cellulaire par apoptose suite à l'ouverture du pore mPTP, favorisant ainsi la libération du cytochrome c dans le cytosol [56].

Au vu du rôle des mitochondries dans la régulation de l'homéostasie du calcium et étant donné que dans plusieurs LSDs (dont la Mucopolipidose de type IV et la forme Juvénile de la NCL) la capacité des mitochondries à tamponner une augmentation de la concentration cytosolique en calcium libre semble altérée [41], nous avons voulu déterminer le rôle potentiel d'une déficience en TPP-1 sur l'homéostasie du calcium intracellulaire par les mitochondries.

La concentration mitochondriale et plus particulièrement matricielle en calcium a donc été mesurée à l'état basal dans des cellules CTL, LINCL et LINCL + TPP-1. Dans un deuxième temps, nous avons également suivi l'évolution de la concentration en calcium matriciel après une stimulation des cellules à l'ionomycine, un ionophore calcique spécifique connu pour induire une augmentation de la concentration en calcium cytosolique libre [199]. Cette stimulation à l'ionomycine a donc été réalisée dans le but d'étudier la capacité des mitochondries à séquestrer le calcium en réponse à une augmentation de la concentration cytosolique. Pour mesurer le calcium matriciel, les cellules ont premièrement été incubées en présence de la sonde fluorescente X-Rhod 5F et l'intensité de fluorescence a été mesurée au spectrofluorimètre pour les différentes conditions expérimentales.

Comme observé à la **Figure 3.12**, la concentration en calcium matriciel à l'état basal est légèrement supérieure dans les cellules LINCL (bien que non significativement différente) que celle mesurée pour des fibroblastes CTL. De plus, dans les cellules LINCL pré-incubées avec la pro-enzyme recombinante TPP-1, la concentration calcique matricielle est significativement plus faible que dans les cellules LINC. Ce résultat suggère que la déficience en TPP-1 pourrait avoir un effet sur la concentration en calcium matriciel à l'état basal. Cette concentration en calcium plus élevée dans les cellules LINCL est compatible avec une plus grande concentration en ATP retrouvée dans ces cellules car à faible concentration, le calcium active 3 enzymes du cycle de Krebs (pyruvate-, α -ketoglutarate-, et isocitrate-déshydrogénases) et favorise la production d'ATP [96]. Pour comprendre ces résultats, il serait intéressant de mesurer l'abondance du calcium dans d'autres compartiments

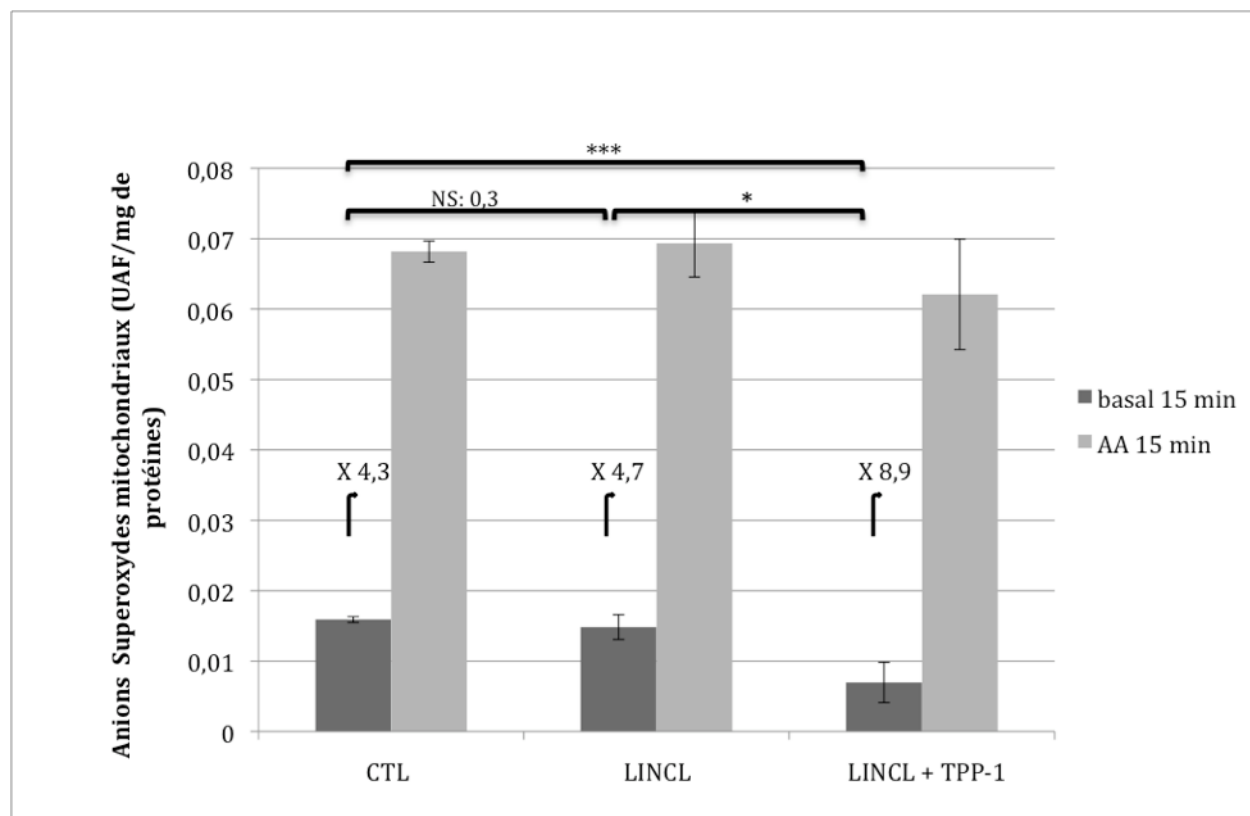


Figure 3.13 : Effet d'une déficience en TPP-1 sur l'abondance en anions superoxydes mitochondriaux

Des fibroblastes CTL et LINCL sont ensemencés dans des boîtes de culture à 12 puits à une densité de 20 000 cellules par puits. Dans la condition LINCL + TPP-1, les cellules ont été incubées en présence de la pro-enzyme TPP-1 pendant 48 h puis maintenues en culture pendant 5 jours dans du milieu sans enzyme. Au terme de ces 7 jours, les cellules sont incubées pendant 10 min à l'obscurité en présence de la sonde MitoSOXTM Red à 10 μ M diluée dans de l'HBSS/CaCl₂ (1 mM). Afin de mesurer la concentration en anions superoxydes mitochondriaux à l'état basal, les cellules sont rincées 3 x avec de l'HBSS/CaCl₂ (1 mM) et l'intensité de fluorescence est mesurée au spectrofluorimètre (λ ex: 518 nm; λ ém: 612 nm). Ensuite, 1 ml de tampon PBS contenant de l'antimycine A à 10 μ M sont ajoutés dans les puits (sauf les blancs) et la mesure de l'intensité de fluorescence est réalisée après 15 min. A la fin de l'expérience, les cellules sont hydrolysées dans 400 μ l de NaOH 1 N pendant 20 min. Le lysat cellulaire est collecté et le contenu en protéines est quantifié au Spectrophotomètre NanoDrop 2000 dans le but de normaliser les résultats obtenus. Ces derniers sont exprimés en unités arbitraires de fluorescence (UAF) normalisées par le contenu en protéines (UAF/ μ g de protéines) et représentent la moyenne \pm 1 écart-type (n=3). *, *** = significativement différent de la concentration en anions superoxydes mitochondriaux à l'état basal des fibroblastes CTL ou LINCL avec, respectivement, $p < 0,05$ et $p < 0,001$ comme déterminé par un test t de Student non pairé. NS = non significativement différent de la concentration en anions superoxydes mitochondriaux basale des fibroblastes CTL.

subcellulaires comme le cytosol et le RE des fibroblastes CTL, LINCL et LINCL + TPP-1. Nous avons au préalable vérifié que le signal de fluorescence détecté était bien associé au calcium matriciel puisque le signal de fluorescence diminue fortement (70 %) dans des cellules incubées en présence de ruthénium red, un inhibiteur de l'uniporteur calcique mitochondrial [200] (donnée non montrée), (voir introduction point : 1.3.3.3).

Ensuite, dans le but d'analyser la capacité des mitochondries à tamponner une augmentation de la concentration cytosolique en calcium, ces cellules ont été incubées pendant 10, 20 et 30 min en présence d'ionomycine à 10 μ M. Les résultats présentés à la **Figure 3.12** montrent une forte augmentation de la concentration du calcium matriciel en réponse à la stimulation des cellules par l'ionomycine. Cependant, même si l'intensité de fluorescence est plus faible dans les cellules pré-incubées avec la pro-enzyme recombinante TPP-1, ce qui correspond probablement à une concentration en calcium plus faible dans ces cellules stimulées par l'ionomycine, l'augmentation de la concentration en calcium matriciel dans les cellules LINCL + TPP-1 et donc la capacité de répondre à une augmentation de la concentration en calcium cytosolique est toujours observée dans les cellules LINCL + TPP-1 et comparable à celle observée pour les conditions CTL et LINCL (2,1 fois d'augmentation par rapport à 1,8 fois). Ce résultat suggère que les mitochondries des cellules CTL, LINCL et LINCL + TPP-1 répondent de manière comparable à une augmentation de la concentration en calcium cytosolique. Ceci mène à la conclusion que les mitochondries ont une capacité comparable à tamponner le calcium et que la déficience en TPP-1 ne semble pas affecter l'homéostasie du calcium dans ces cellules.

Toutefois, l'interprétation de ces résultats reste difficile étant donné qu'il n'est pas certain que le chargement de la sonde ne soit pas affecté par la pré-incubation de la pro-enzyme TPP-1 dans les cellules LINCL. En effet, la pré-incubation pourrait également avoir un effet interférentiel sur le chargement en sonde, ce qui expliquerait pourquoi la concentration en calcium matriciel est systématiquement plus faible dans ces conditions. Dans le but de remédier à ce problème, il serait intéressant de mesurer la concentration en calcium en utilisant une méthode alternative, telle que l'électroporation de cellules avec des plasmides codant pour la protéine aequorine mitochondriale, une photoprotéine qui subit une réaction irréversible une fois liée au calcium, et produit de la lumière [201]. L'efficacité de transfection devrait aussi être vérifiée car elle pourrait également être différente pour les différentes conditions expérimentales. Une autre manière de mesurer la concentration du calcium mitochondrial serait d'utiliser le Pericam-ratiométrique adressé aux mitochondries (RPmt). Il s'agit d'un biosenseur du calcium formé de la fusion de la protéine fluorescente jaune circulairement permutee (cpYFP) et de la calmoduline [202]. Les cellules pourraient ainsi être électroporées avec un plasmide codant pour le RPmt, qui se lierait ensuite au calcium mitochondrial induisant un shift de son pic d'excitation dont la fluorescence réémise peut être mesurée en microscopie à fluorescence [202].

3.9 Effet de la déficience en TPP-1 sur la production de ROS mitochondriaux

Les mitochondries représentent, même en conditions basales, une source importante de ROS suite à la libération d'électrons depuis les complexes I et III de la chaîne respiratoire. Ces électrons sont alors acceptés par des molécules d'oxygène (réduction monovalente de l'oxygène), ce qui génère des ROS et plus particulièrement, dans un premier temps, des radicaux anioniques superoxydes [84,85]. Si de faibles concentrations en ROS peuvent agir comme des messagers secondaires activant différentes voies de signalisation telles que les voies JAK/STATs, MAPK/NF- κ B, des concentrations élevées en ROS sont connues pour engendrer des stress oxydatifs menant à des dommages cellulaires et des dysfonctionnements mitochondriaux [87,88].

Protéine	mRNA "Fold Change" (LINCL + TPP-1/LINCL)	Fonction
<i>Protéines apoptotiques</i>		
PUMA	2,09	Rôle dans l'apoptose
Bcl-2	1,33	Rôle dans l'apoptose
Bnip3	0,49	Rôle dans l'apoptose, la nécrose et l'autophagie
<i>Protéines de transport</i>		
CPT1B	1,43	Carnitine palmitoyltransférase 1B
SLC25A13	0,57	Echangeur Aspartate/Glutamate
SLC25A15	0,68	Transporteur de l'ornithine
SLC25A2	3,30	Transporteur de l'ornithine
SLC25A21	2,33	Transporteur des oxodicarboxylates C5-C7
SLC25A27 (UCP4)	1,59	Transport d'ions
SLC25A31	1,49	« Solute Carrier Family 25 member 31 »
UCP1	0,30	Transport d'ions
<i>Enzyme anti-oxydante</i>		
SOD1	1,34	Superoxide dismutase (Cu-Zn)
<i>Localisation mitochondriale</i>		
NEFL	1,38	Polypeptide léger du neurofilament (neurones)
<i>Protéine de la chaîne respiratoire mitochondriale</i>		
ATP4A	0,46	Echangeur H^+/K^+ (enzyme gastrique)
ATP5G3	1,45	Sous-unité du complexe F_0 (transport H^+)
ATP6V1E2	1,51	Acidification de l'acrosome (transport H^+)
Cox6C	1,64	Transfert d' e^- du complexe IV à l' O_2
LHPP	1,44	Hydrolyse les liens oxygène-phosphate du pyrophosphate, et les liens nitrogène-phosphate de la phospholysine
SDHC	2,31	Sous-unité du complexe II de la chaîne respiratoire
B2M	1,45	Composant du MHC classe I

Tableau 3.1 : Effet d'une déficience en TPP-1 sur l'expression de gènes codant pour des protéines mitochondriales

Deux PCR-Arrays ont été utilisés afin d'étudier l'expression de gènes codant pour différentes protéines mitochondriales (168 au total) dans les cellules LINCL et LINCL + TPP-1. Les cDNA ont été générés par rétrotranscription d'ARN total (5 µg) extrait à partir de LINCL et LINCL + TPP-1. 25 µl d'une mixture réactionnelle contenant les cDNA (voir matériel et méthodes point 1.9) sont ensuite déposés dans chacun des puits des deux plaques 96 puits contenant les primers spécifiques. Une RT-qPCR en temps réel a ensuite été réalisée au moyen de l'appareil PCR « Applied Biosystem 7900 ». L'abondance relative des transcrits a été quantifiée selon la méthode $\Delta\Delta Ct$.

La table ci-dessus reprend les différents gènes (et leur principale fonction) pour lesquels une différence d'abondance a été observée dans les cellules LINCL + TPP-1 par rapport aux cellules LINCL. Les résultats sont exprimés en valeur relative correspondant au nombre de fois l'abondance de l'ARNm du gène d'intérêt dans les cellules LINCL pour $n=1$.

Dans le but d'étudier les effets potentiels d'une déficience en TPP-1 sur la production de ROS, l'abondance de ceux-ci a été mesurée dans les cellules CTL, LINCL et LINCL + TPP-1. L'abondance des anions superoxydes ($O_2^{\cdot-}$) a été analysée en utilisant la sonde MitoSox Red, une sonde spécifiquement oxydée par les $O_2^{\cdot-}$ mitochondriaux. L'abondance des $O_2^{\cdot-}$ a été mesurée dans les cellules à l'état basal et après une incubation de 15 min en présence d'antimycine A, une molécule connue pour augmenter la production de ROS en inhibant le complexe III de la chaîne respiratoire mitochondriale [88]. L'intensité de fluorescence a ensuite été mesurée au spectrofluorimètre.

Comme observé à la **Figure 3.13**, alors qu'il n'y a pas de différence d'abondance des $O_2^{\cdot-}$ à l'état basal entre les cellules CTL et LINCL, la présence de la TPP-1 semble faiblement (mais significativement) diminuer l'abondance des anions superoxydes. Les résultats indiquent également que les lignées cellulaires CTL et LINCL répondent de manière comparable à une incubation des cellules en présence d'antimycine A, par une augmentation de la production d' $O_2^{\cdot-}$ (respectivement 4,3 et 4,7 fois d'augmentation par rapport à l'intensité de fluorescence mesurée dans les conditions basales). De manière intéressante, la pré-incubation des cellules LINCL avec la pro-enzyme TPP-1 semble modifier la réponse mitochondriale à la présence d'antimycine A, menant à un fold increase supérieur (8,9 fois d'augmentation par rapport à la mesure basale). Nous attirons cependant l'attention sur le fait que, comme pour la mesure de la concentration en calcium matriciel, l'interprétation des résultats est difficile étant donné qu'il n'est pas certain que la pré-incubation des cellules en présence de la TPP-1 n'affecte pas le chargement de la sonde fluorescente. Afin de contourner ce problème, il serait par exemple intéressant de mesurer l'abondance des ROS en utilisant la sonde ratiométrique mito-Ro-GFP qui est sensible à l'oxydation. Les cellules pourraient être électroporées avec un plasmide codant pour la mito-Ro-GFP et l'oxydation de cette sonde serait ensuite mesurée par cytométrie de flux [203].

Dans la suite de ce travail, pour tenter de mieux comprendre l'impact éventuel de la déficience en TPP-1 sur la population mitochondriale des cellules LINCL, nous avons analysé l'effet de la déficience enzymatique en TPP-1 sur l'expression de gènes nucléaires codant pour des protéines mitochondriales assurant différentes fonctions au sein de l'organite.

3.10 Effet d'une déficience en TPP-1 sur l'expression de gènes nucléaires codant pour des protéines mitochondriales

Dans le but d'étudier les effets éventuels d'une déficience en TPP-1 sur l'expression de gènes nucléaires codant pour différentes protéines impliquées dans la biologie des mitochondries, comme les protéines UCP1, MFN1 et SOD1 (Superoxide dismutase (Cu-Zn) 1), l'expression de gènes a été analysée dans des cellules LINCL et LINCL + TPP-1 au moyen de 2 PCR-Arrays. Ces derniers ont permis d'analyser l'expression de gènes codant pour : des transporteurs mitochondriaux, dont le transporteur SLC25A15 (Solute Carrier Family 25 Member 15) qui est impliqué dans le transport de l'ornithine depuis le cytosol vers la mitochondrie ; des protéines impliquées dans le contrôle du potentiel de membrane mitochondriale, comme la protéine UCP1 ; des protéines régulant la translocation des protéines au travers la MME telles que le récepteur du système d'importation TOM (TOM20); des protéines impliquées dans les phénomènes de fusion et fission mitochondriales; et des protéines impliquées dans la chaîne respiratoire mitochondriale, dont Cox6C qui régule le transfert d'électrons du complexe IV à l'oxygène.

Parmi les 168 gènes dont l'expression a été analysée au moyen des PCR Arrays, seul les 20 gènes pour lesquels une modification de l'expression a été observée entre les fibroblastes LINCL et LINCL contenant l'enzyme TPP-1 active ont été repris au **Tableau 3.1**. Ces gènes codent pour des protéines impliquées dans différents aspects de la biologie mitochondriale,

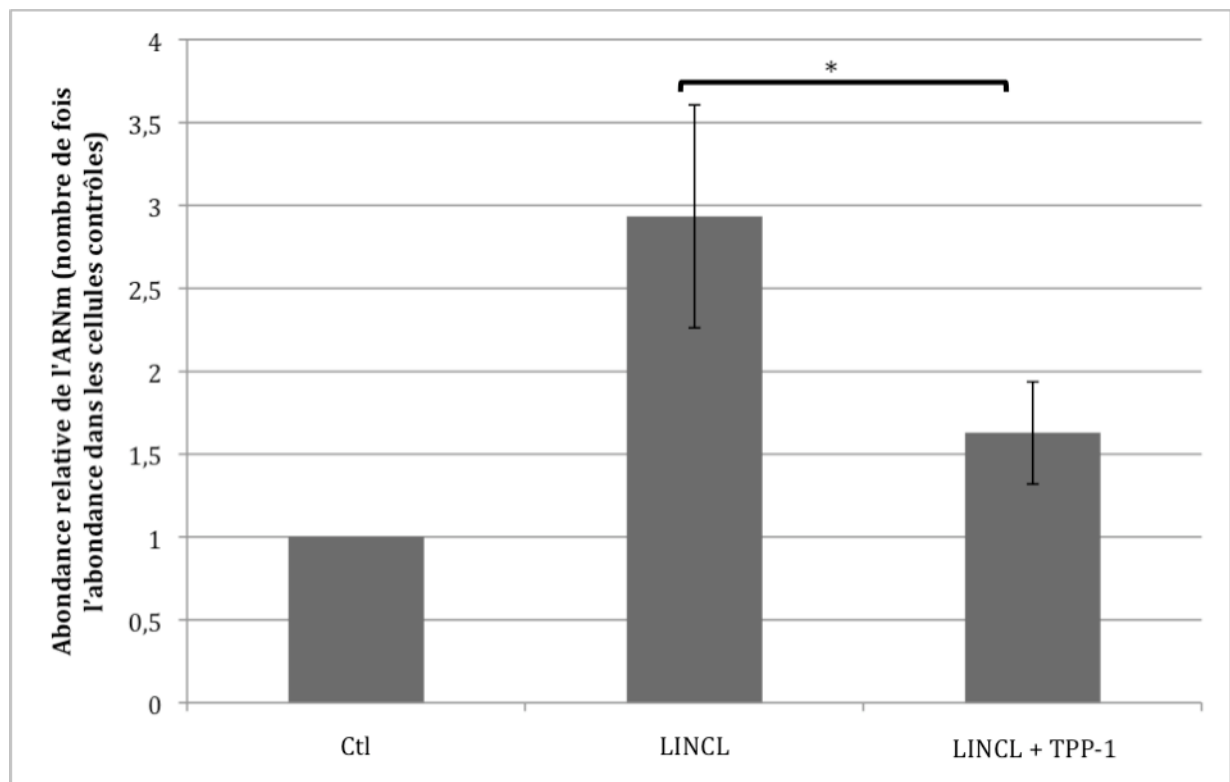


Figure 3.14 : Abondance relative du transcrit de *Bnip3* dans les cellules CTL, LINCL et LINCL + TPP-1

Des fibroblastes CTL et LINCL sontensemencés dans des boîtes de culture de 25 cm² à une densité de 150 000 cellules par boîte. Dans la condition LINCL + TPP-1, les cellules ont été incubées en présence de la pro-enzyme TPP-1 pendant 48 h puis maintenues en culture pendant 5 jours dans du milieu sans enzyme. Au terme de ces 7 jours, l'ARN total des cellules a été extrait puis rétrotranscrit. La RT-qPCR en temps réel a ensuite été réalisée à partir d'un volume final de 25 µl constitué de : 5 µl d'ADNc et 20 µl d'un mélange réactionnel PCR contenant les primers sens et anti-sens pour *Bnip3* ainsi que du SYBR Green. L'abondance des transcripts a été quantifiée selon la méthode $\Delta\Delta C_t$ et normalisée par les valeurs du gène codant pour la GAPDH utilisé comme gène de référence. Les résultats sont exprimés en valeur relative correspondant au nombre de fois l'abondance de l'ARNm de *Bnip3* dans les cellules contrôles (CTL) et représentent la moyenne \pm 1 écart-type pour 3 expériences indépendantes (n=3). * = significativement différent de l'abondance en ARNm *Bnip3* des cellules LINCL, avec $p < 0,05$, comme déterminé à partir d'un test t de Student non pairé.

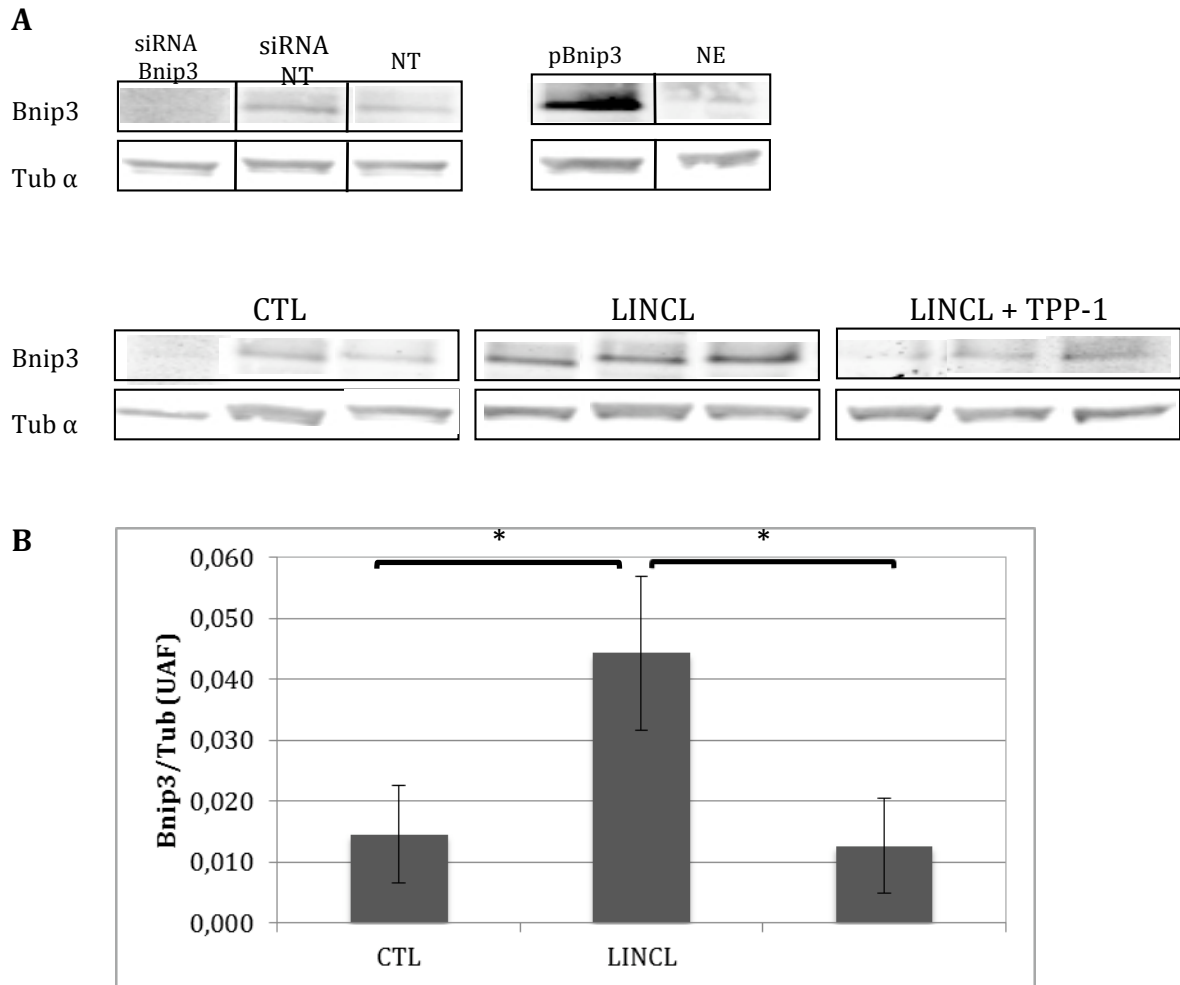


Figure 3.15 : Analyse de l'abondance de Bnip3 dans les cellules CTL, LINCL et LINCL + TPP-1 en Western blot à fluorescence

Des fibroblastes CTL et LINCL sont ensemencés dans des boîtes de culture de 75 cm² à une densité de 300 000 cellules par boîte. Dans la condition LINCL + TPP-1, les cellules ont été incubées en présence de la pro-enzyme TPP-1 pendant 48 h puis maintenues en culture pendant 5 jours dans du milieu sans enzyme. Au terme de ces 7 jours, l'abondance de la protéine Bnip3 a ensuite été analysée en Western blot à fluorescence réalisé à partir de 20 µg de protéines de lysats (clairs/totaux) préparés à partir des cellules. La détection de la protéine Bnip3 a été réalisée en utilisant un anticorps primaire (monoclonal) IgG de souris anti-Bnip3 qui a ensuite été révélé par un anticorps secondaire anti-IgG de souris couplé au fluorochrome IRDY 800 nm. La charge protéique des différentes pistes a été vérifiée par immunodétection de l' α -tubuline. Afin de localiser précisément et avec certitude la bande correspondant à Bnip3, l'abondance de la protéine a également été révélée sur des extraits de cellules LINCL transfectées à l'aide d'un siRNA dirigé contre Bnip3 ou avec un plasmide d'expression contenant le cDNA de Bnip3.

B. La quantification de l'intensité de fluorescence correspondant aux bandes d'intérêt a été réalisée en utilisant le logiciel Odyssey. Les valeurs de fluorescence ont ensuite été normalisées par l'intensité de fluorescence des bandes α -tubuline correspondantes. Les résultats sont exprimés en unités arbitraires de fluorescence (UAF) normalisées et représentent la moyenne \pm 1 écart-type (n=3). * = significativement différent des fibroblastes LINCL avec $p < 0,05$, comme déterminé par un test t de Student non païré.

telles que les gènes codant pour les protéines pro-apoptotiques PUMA et Bnip3, qui sont, respectivement, sur- et sous-exprimées (au niveau du transcrit) dans les cellules LINCL + TPP-1. Différents gènes codant les protéines de la famille 25 regroupant un ensemble de transporteurs solubles (SLC25) semblent également différenciellement exprimés dans les cellules LINCL + TPP-1.

Nous constatons que certains candidats qui semblent différenciellement exprimés présentent des variations assez faibles. De plus, ces PCR arrays génèrent souvent des faux positifs/faux négatifs et il est donc important de vérifier les données obtenues par RT-qPCR notamment.

3.11 La protéine Bnip3 est bien surexprimée dans les cellules LINCL

Les résultats obtenus pour l'expression de gènes à l'aide des PCR Arrays semblent indiquer que la déficience enzymatique de la TPP-1 affecte l'expression de gènes codant pour différentes protéines mitochondriales. Afin de confirmer/infirmier ces résultats, le niveau d'expression de 7 de ces 20 gènes (PUMA, Bnip3, SOD, ATP5G3, Cox6C, LHPP, SDHC) a ensuite été analysé dans les cellules CTL, LINCL et LINCL + TPP-1 par la technique de RT-qPCR en temps réel. Nous devons encore ajouter que la confirmation a été réalisée sur des extraits d'ARN total préparés à partir de cultures de cellules différentes et donc que la validation ne concerne pas uniquement la validité des données obtenues pour les PCR arrays mais tient compte de la variation biologique éventuelle.

De manière surprenante (car le PCR array et la RT-qPCR en temps réel sont des techniques qui reposent sur des approches expérimentales comparables), parmi les tentatives de confirmation réalisées seule les modifications de l'abondance du transcrit Bnip3 ont pu être confirmées (**Figure 3.14**). Sur cette figure, nous voyons clairement que l'expression de Bnip3 est augmentée dans les cellules LINCL et que le niveau d'expression diminue dans les cellules ayant récupéré une activité TPP-1 pendant 7 jours.

Dans le but de déterminer si les modifications de l'abondance du transcrit de Bnip3 sont également retrouvées au niveau protéique, nous avons analysé l'abondance de Bnip3 en Western Blot à fluorescence dans les cellules CTL, LINCL et LINCL + TPP-1. L'anticorps IgG de souris anti-Bnip3 utilisé étant très peu spécifique, l'identification de la bande d'intérêt pour Bnip3 a été recherchée sur des lysats totaux de cellules LINCL transfectées avec un siRNA dirigé contre Bnip3 ou avec un plasmide contenant l'ADNc codant pour la protéine Bnip3. Ces conditions de sous-expression et de surexpression de la protéine Bnip3 ont permis de déterminer la localisation de la bande d'intérêt sur le blot correspondant à Bnip3 avec certitude. Les résultats obtenus sont représentés à la **Figure 3.15** et confirment que la protéine Bnip3 est plus abondante dans les cellules LINCL que dans les cellules contrôles, et que la pré-incubation des cellules LINCL en présence de la pro-enzyme TPP-1 restaure une abondance basale de la protéine.

Comme mentionné dans l'introduction, Bnip3 est une protéine pro-apoptotique de la famille des protéines Bcl2. Elle a été décrite comme pouvant être impliquée dans l'induction de la mort cellulaire par apoptose, nécrose et autophagie mais également dans les phénomènes de survie cellulaire en favorisant la dégradation des mitochondries non fonctionnelles par mitophagie [102,105]. Il reste cependant beaucoup d'interrogations quant à la participation de Bnip3 dans la mort et la survie cellulaire, tout comme les conditions cellulaires favorisant une réponse plutôt qu'une autre. De même, bien que la surexpression de la protéine Bnip3 soit associée à différentes pathologies, dont la maladie d'Alzheimer et le cancer [105], les effets d'une sur-expression de la protéine dans la pathogenèse des LSDs n'a pas encore été démontrée. De ce fait, dans la suite de ce mémoire nous nous sommes intéressés au rôle éventuel de la protéine Bnip3 dans les cellules LINCL, ainsi qu'à l'activité d'un facteur de

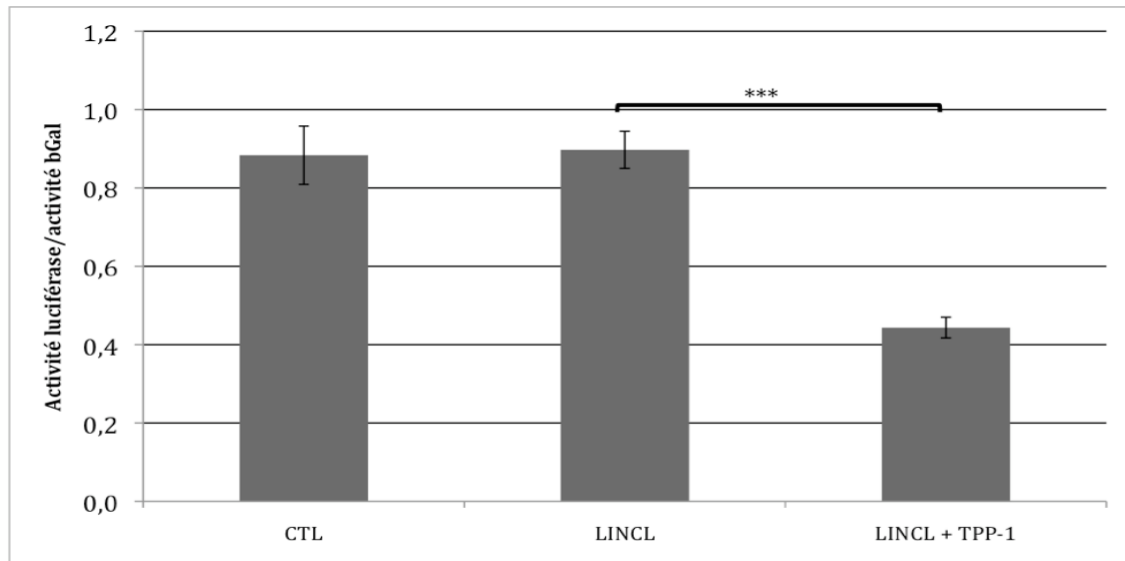


Figure 3.16 : Test d'activité du facteur HIF-1 dans les fibroblastes CTL, LINCL et LINCL + TPP-1

Des fibroblastes CTL et LINCL sont ensemencés dans des boîtes de culture de 75 cm² à une densité de 300 000 cellules par boîte. Dans la condition LINCL + TPP-1, les cellules ont été incubées en présence de la pro-enzyme TPP-1 pendant 48 h puis maintenues en culture pendant 4 jours dans du milieu sans enzyme. Au terme de ces 6 jours, les fibroblastes CTL, LINCL et LINCL + TPP-1 sont co-transfectés au Superfect pendant 3 h avec 1,125 µg d'un plasmide rapporteur contenant le gène de la luciférase placé sous le contrôle d'un promoteur possédant 6 fois la séquence consensus reconnue par HIF-1 (pGL3-(PGK-HRE6)-tk-luc) et 0,375 µg d'un plasmide d'expression codant pour le gène de la β-galactosidase placé sous contrôle du promoteur CMV (pCMV-LacZ). Au terme de la transfection, les cellules récupèrent pendant 21 h dans du milieu MEM complet. Elles sont ensuite lysées pendant 15 min dans 200 µl du tampon de lyse (Kit Luciférase Assay System Progmega). Les lysats sont centrifugés 3 min à 13 000 rpm. Le dosage de la luciférase est réalisé sur 20 µl de lysat mélangés à 100 µl de mixture réactionnelle et la lecture de la luminescence est réalisée directement au luminomètre. La mesure de l'activité de la β-galactosidase est également réalisée à partir de 20 µl de lysat mélangé à 180 µl de mixture réactionnelle contenant le substrat de fluorescence 4-Methylumbelliferyl β-D-Galactopyranoside.

Les résultats de l'activité luciférase sont finalement normalisés en divisant l'activité de la luciférase (URL) par l'activité de la β-galactosidase (UAF). Les résultats sont exprimés en URL/UAF et représentent la moyenne ± 1 écart-type (n=3). *** = significativement différent de l'activité du facteur HIF-1 des fibroblastes LINCL, avec $p < 0,001$, comme déterminé par un test t de Student non pairé.

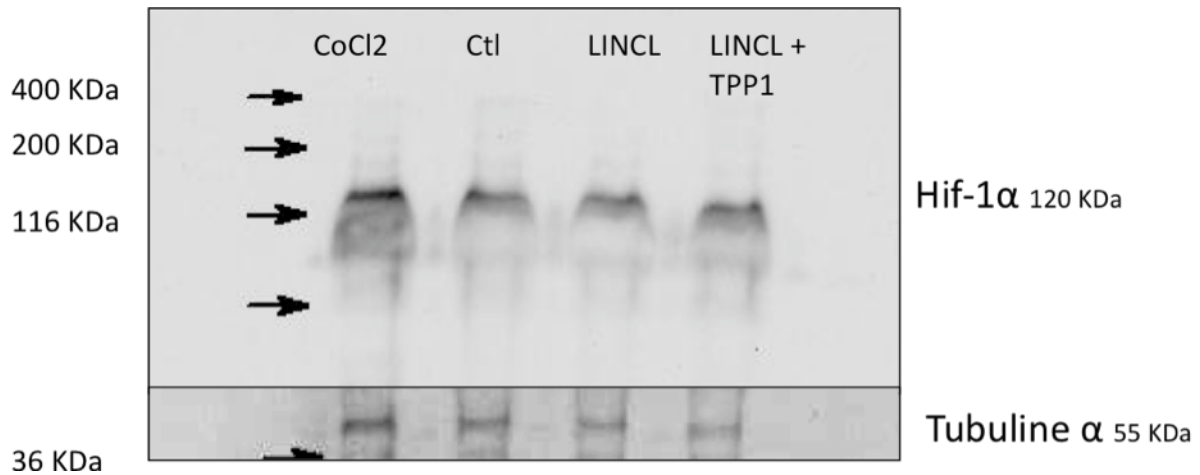


Figure 3.17 : Abondance de la sous-unité HIF-1α dans les cellules CTL, CTL incubées en présence de CoCl₂, LINCL et LINCL + TPP-1

Des fibroblastes CTL et LINCL sontensemencés dans des boîtes de culture de 75 cm² à une densité de 300 000 cellules par boîte. Dans la condition LINCL + TPP-1, les cellules ont été incubées en présence de la pro-enzyme TPP-1 pendant 48 h puis maintenues en culture pendant 5 jours dans du milieu sans enzyme. Au terme de ces 7 jours, des lysats clairs sont préparés. L'abondance de la sous-unité HIF-1α du facteur de transcription HIF-1 est ensuite analysée par Western blot en chémiluminescence, réalisé sur 60 µg de protéines. La détection de la protéine a été réalisée en utilisant un anticorps primaire monoclonal IgG de souris anti-HIF-1α, révélé par anticorps secondaire anti-IgG de souris HRP . L'équivalence de la charge protéique a été vérifiée par l'immunodétection de l'α-tubuline. Un contrôle positif est également réalisé en incubant des cellules CTL avec 150 µM de CoCl₂ pendant 16 h.

transcription susceptible de conduire à la surexpression du gène codant pour Bnip3 dans les cellules affectées par la déficience en TPP-1.

3.12 Effet d'une déficience en TPP-1 sur l'activité du facteur de transcription HIF-1

Il est connu que l'expression du gène codant pour Bnip3 est régulée par différents facteurs de transcription dont HIF-1, FoxO3, PLAGL2, E2F1 et NF- κ B [105]. Le facteur de transcription HIF-1 étant souvent décrit comme étant responsable de la surexpression de la protéine Bnip3, y compris dans un contexte non hypoxique, nous sommes de ce fait intéressés à l'étude de ce facteur. En effet, certains métaux dont le cobalt, le nickel et le cuivre activent le facteur HIF-1 en normoxie, conduisant à l'activation de l'expression de gènes, dont Bnip3 [204,205]. De plus, la sensibilité de certaines cellules à certaines cytokines et/ou facteurs de croissance comme le TGF- β conduit également à activer le facteur HIF-1 dans un contexte non hypoxique [206]

L'activité du facteur de transcription (HIF-1) a donc été analysée dans les cellules CTL, LINCL et LINCL + TPP-1 à l'aide d'un plasmide contenant un gène rapporteur luciférase dont l'expression est placée sous le contrôle d'un promoteur sensible à ce facteur et ce, afin de rechercher le rôle éventuel de ce facteur de transcription dans la surexpression du gène codant pour la protéine Bnip3 dans les cellules présentant la déficience en TPP-1.

Premièrement, un test d'activité du facteur HIF-1 a été réalisé dans les cellules CTL, LINCL et LINCL + TPP-1. Dans cette expérience, les cellules ont été co-transfectées avec un plasmide contenant le gène rapporteur luciférase (pGL3-(PGK-HRE6)-tk-luc) dont l'expression est placée sous contrôle d'un promoteur possédant les séquences de reconnaissance du facteur HIF-1 (HRE) et un plasmide (pCMV-LacZ) codant pour le gène de la β -galactosidase dont l'expression est placée sous le contrôle d'un promoteur constitutif (CMV : Cytomegalo virus), utilisé pour la normalisation des résultats et donc, comme contrôle de l'efficacité de transfection. Comme observé à la **Figure 3.16**, l'activité du facteur HIF-1 mesurée dans les cellules CTL et LINCL est identique. Cependant, la restauration de l'activité enzymatique de la TPP-1 dans les cellules LINCL diminue significativement l'activité de ce facteur de transcription. Ainsi, les résultats obtenus semblent indiquer que l'activité du facteur HIF-1 pourrait être affectée par la déficience en TPP-1.

Afin d'approfondir ces résultats, l'abondance de la sous-unité α du facteur HIF-1 a ensuite été analysée par la technique du Western blot (chémiluminescence). Comme mentionné dans l'introduction, en conditions basales, la sous-unité HIF-1 α est immédiatement dégradée par la voie du protéasome après sa synthèse [174]. Par contre, la condition hypoxique, par exemple, stabilise HIF-1 α , qui va alors se lier à HIF-1 β au niveau du noyau pour former un complexe HIF-1 actif. L'étude de l'abondance de la sous-unité α est donc représentative de l'abondance du facteur HIF-1 actif dans les cellules. Un contrôle positif a également été réalisé en incubant des cellules CTL avec du CoCl₂ à 150 μ M pendant 16 h. Ce dernier est connu pour induire une hypoxie chimique qui provoque la stabilisation du facteur HIF-1 α [205].

Les résultats obtenus sont présentés à la **Figure 3.17**. Comme attendu, l'abondance de la sous-unité HIF-1 α est plus élevée dans les cellules CTL pré-incubées avec du CoCl₂. Ceci résulte de la stabilisation de la protéine par la condition hypoxie chimique. Cependant, l'abondance de HIF-1 α est comparable dans les cellules CTL, LINCL et LINCL + TPP-1, suggérant que la déficience en TPP-1 n'affecte pas l'abondance du facteur de transcription HIF-1 dans les cellules LINCL et que l'expression de HIF-1 α n'est pas sensible à la restauration de l'activité enzymatique dans ces cellules.

Ce résultat étant différent des données obtenues pour l'activité de HIF-1, une dernière expérience a été réalisée afin de déterminer la localisation du facteur HIF-1 α dans les cellules

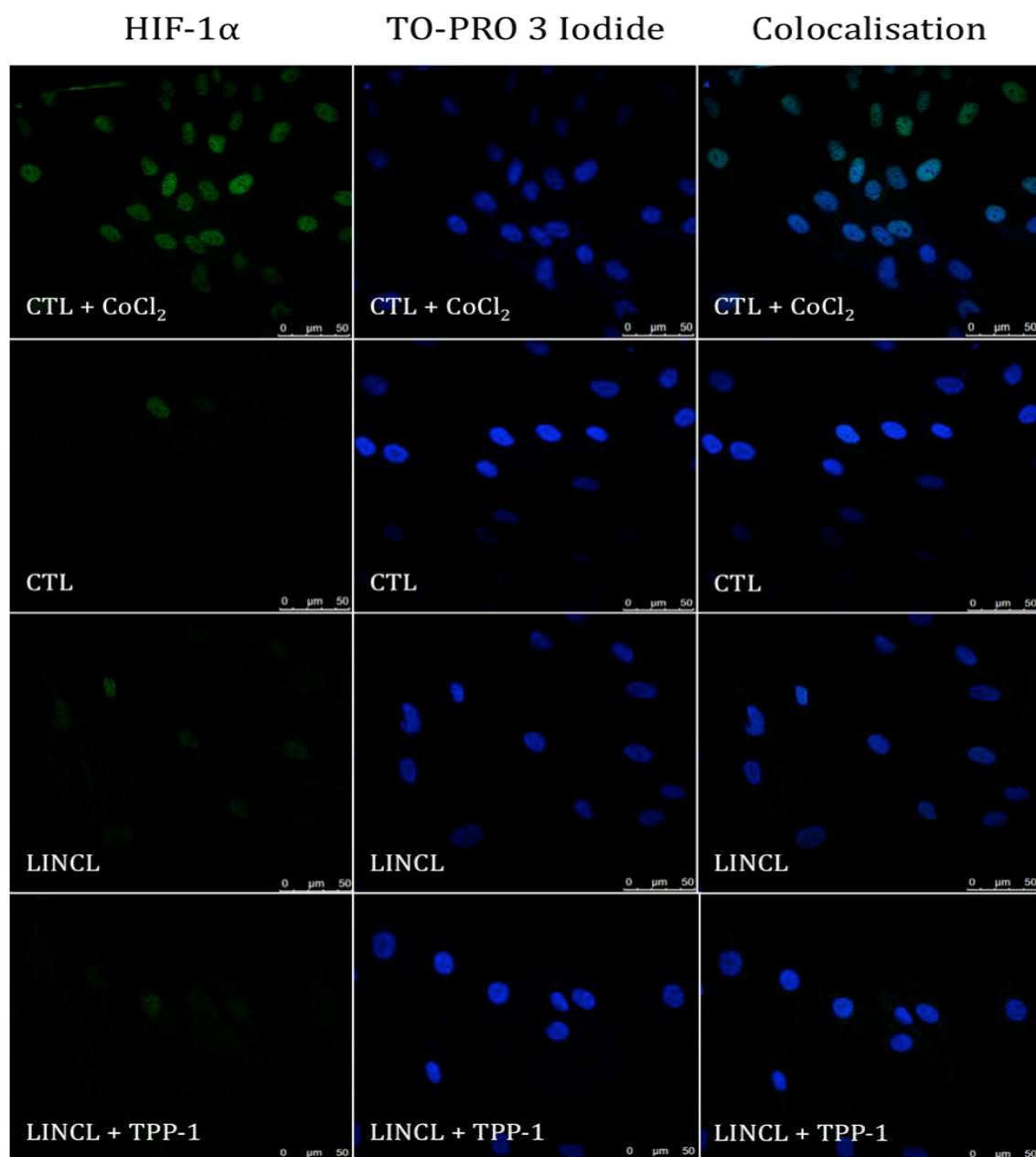


Figure 3.18 : Micrographies de l'immuno-marquage en fluorescence et observation en microscopie du facteur HIF-1 α dans les cellules CTL, CTL + CoCl₂, LINCL et LINCL + TPP-1

Des fibroblastes CTL et LINCL sontensemencés à une densité de 4000 cellules/puits sur des lamelles couvre-objets déposées dans les puits d'un boîte de culture à 24 puits. Dans la condition LINCL + TPP-1, les cellules ont été incubées en présence de la pro-enzyme TPP-1 pendant 48 h puis maintenues en culture pendant 5 jours dans du milieu sans enzyme. Au terme de ces 7 jours, les cellules sont rincées 3 x avec du PBS puis fixées pendant 10 min avec 500 μ l de PFA à 4 %. Les cellules sont ensuite perméabilisées pendant 5 min au moyen de PBS + Triton X-100 1 % et sont ensuite incubées, à température ambiante, en présence de l'anticorps primaire IgG de souris anti-HIF-1 α pendant 2 h. Les cellules sont alors rincées à l'aide de PBS-BSA 1 % et incubées ensuite pendant 1 h (à l'obscurité) en présence de l'anticorps secondaire anti-IgG de souris Alexa Fluor 488. Un marquage de 35 min au TO-PRO 3 Iodide est également réalisé pour marquer les noyaux cellulaires. Les lamelles couvre-objets sont finalement montées sur des lames porte-objets à l'aide d'une goutte de Mowiol, puis les cellules sont analysées au microscope confocal. Un contrôle positif est également réalisé en incubant des cellules CTL avec du CoCl₂ à 150 μ M pendant 16 h.

Signal vert : λ exc : 490 nm et λ ém : 535 nm, signal bleu λ exc : 640 nm et λ ém : 660 nm

par un marquage en immunofluorescence et une observation en microscopie confocale. Le but de cette expérience était d'étudier une éventuelle translocation différentielle de HIF-1 dans le noyau des cellules CTL, LINCL et LINCL + TPP-1. En effet, même si l'abondance globale de HIF-1 α n'est pas modifiée dans les cellules LINCL et LINCL + TPP-1, il est possible que le facteur s'accumule au niveau du noyau en réponse à la déficience en TPP-1.

Pour vérifier cette possibilité, les fibroblastes CTL, CTL + CoCl₂, LINCL et LINCL + TPP-1 ont été marqués au moyen d'un anticorps dirigé contre HIF-1 α . Un marquage au TO-PRO 3 Iode a également été réalisé afin de marquer les noyaux cellulaires. Les cellules ont ensuite été observées en microscopie confocale (**Figure 3.18**). Les micrographies obtenues montrent que la pré-incubation des cellules CTL en présence de CoCl₂ induit bien la stabilisation et le recrutement de la sous-unité HIF-1 α au niveau du noyau. Cependant, le facteur est peu ou pas détecté dans les cellules CTL, LINCL et LINCL + TPP-1.

Nous pouvons donc conclure que la déficience en TPP-1 ne conduit pas à une augmentation de l'activité du facteur de transcription HIF-1, ni à l'accumulation/stabilisation de la sous-unité HIF-1 α , pas plus qu'à une accumulation dans les noyaux des cellules LINCL. Il est donc peu probable que ce facteur soit responsable de l'augmentation de l'expression de Bnip3 observée dans les cellules LINCL (**Figures 3.14 et 3.15**). Ces résultats indiquant que le facteur de transcription HIF-1 n'est probablement pas le facteur de transcription impliqué dans la surexpression de la protéine Bnip3 dans les cellules LINCL, d'autres facteurs de transcription vont devoir être analysés dans le futur afin d'identifier le facteur de transcription qui est impliqué dans l'augmentation de l'expression de Bnip3 dans les cellules présentant une déficience en TPP-1.

3.13 Effet d'une déficience en TPP-1 sur la sensibilité des cellules à l'induction de la mort cellulaire par apoptose :

Nous avons vu dans l'introduction de ce travail (voir point 1.3.4) que la protéine Bnip3 est connue pour induire la mort cellulaire par apoptose en réponse à un stress cellulaire comme l'hypoxie et l'ischémie [105]. Cependant les cellules LINCL surexprimant le gène codant pour la protéine Bnip3 ne meurent pas spontanément par apoptose. Nous avons donc émis l'hypothèse que le recrutement de la protéine en membrane mitochondriale nécessaire à son action pro-apoptotique [105] ne se passerait que dans des conditions particulières comme lors d'un stress oxydatif ou hypoxique.

Pour terminer ce travail, nous avons donc voulu étudier les effets possibles d'une déficience en TPP-1 sur la sensibilité des cellules à l'apoptose induite par l'antimycine A, une molécule décrite pour induire l'apoptose suite à une augmentation de la production des ROS [88]. Le but de ces expériences à caractère exploratoire était, à terme, de pouvoir étudier le rôle éventuel de la surexpression de Bnip3 dans la sensibilité des cellules LINCL à l'apoptose induite.

Nous avons donc mis au point un modèle d'induction de l'apoptose des cellules en réponse à une stimulation par l'antimycine A. Les paramètres de mortalité cellulaire qui sera suivi pour les cellules CTL, LINCL et LINCL + TPP-1 repose sur un test MTT, la libération de la LDH et la quantification (par un test de type ELISA) des mono- et oligo-nucléosomes générés par l'action de l'endonucléase DFF40/CAD au cours de la réponse apoptotique [207]. Ainsi, la quantification des fragments d'ADN générés permet d'évaluer la mortalité cellulaire par apoptose.

Premièrement, afin d'étudier la mort cellulaire en conditions basales et surtout en réponse à une incubation des cellules CTL, LINCL et LINCL + TPP-1 en présence d'antimycine A, différentes mises au point ont été réalisées au préalable sur des cellules CTL dans le but de rechercher et d'optimiser les conditions expérimentales (concentration en antimycine A et temps d'incubation) permettant d'induire la mort cellulaire dans notre modèle

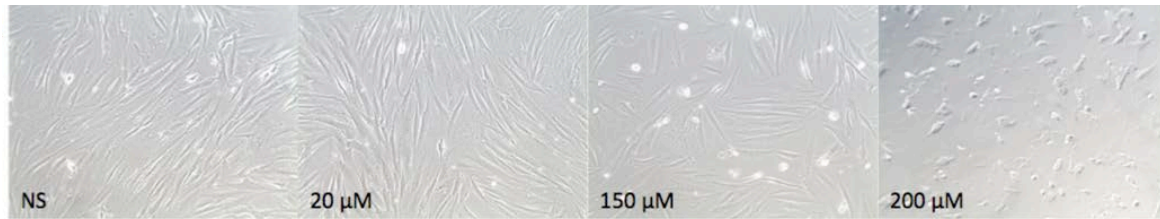


Figure 3.19 : Micrographies prises en microscopie en contraste de phase de fibroblastes contrôles incubés en présence de différentes concentration en antimycine A pendant 24 h

Les cellules CTL sontensemencées dans des boîtes de culture à 24 puits à une densité de 23 000 cellules/puits. Le lendemain, les cellules ont atteint la confluence et sont incubées en présence ou en absence (NS : non stimulé) de concentrations croissantes en antimycine A (de 20 μ M à 200 μ M) diluée dans du milieu MEM complet pendant 24 h.

Au terme des incubations, des micrographies sont prises en microscopie à contraste de phase.

Objectif : PL Fluotar 6,3/0,20 Phaco

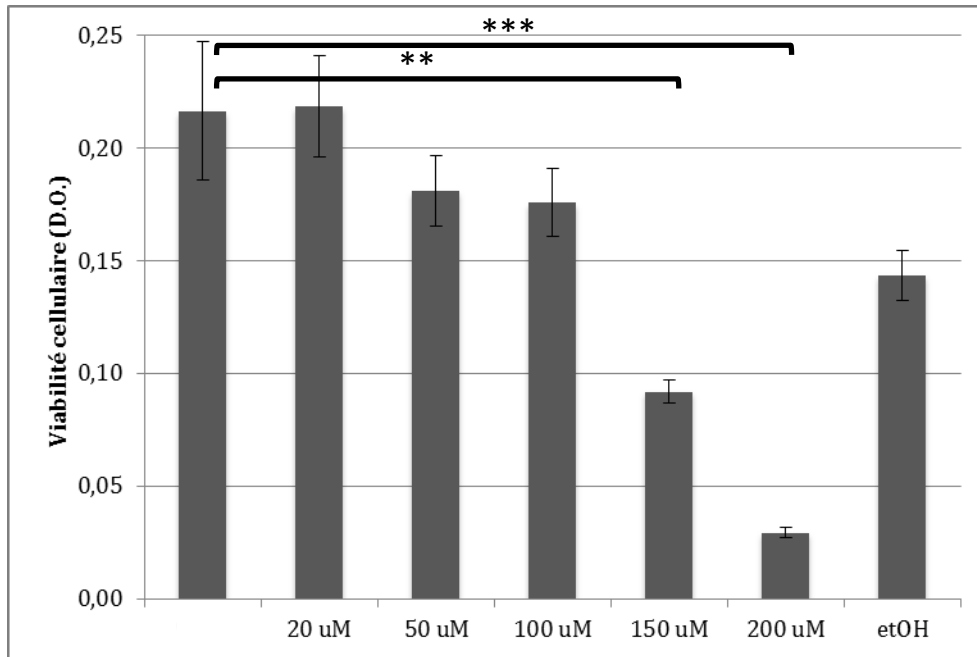


Figure 3.20 : Effet de l'antimycine A sur la viabilité cellulaire de fibroblastes contrôles, test MTT :

Des fibroblastes contrôles sont ensemencés dans des boîtes de culture à 24 puits à une densité de 23 000 cellules/puits. Le lendemain, les cellules ont atteint la confluence et sont incubées en présence (ou en absence) de concentrations croissantes en antimycine A (de 20 μ M à 200 μ M) diluée dans du milieu MEM complet pendant 24 h. Les cellules sont alors rincées avec 1 ml de PBS puis incubées pendant 2 h à 37 °C avec 1 ml de MTT (3 mM) (Sigma) dilué dans du milieu de culture MEM complet (sauf les blancs). Au terme de l'incubation, la solution est décantée et les cellules sont incubées en présence de 1 ml de solution de solubilisation du formazan pendant 16 h à 37 °C et sous légère agitation rotative. Finalement, l'absorbance de la solution de formazan est mesurée au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 570 nm.

Les résultats sont exprimés en unités d'absorbance (D.O.) et représentent la moyenne \pm 1 écart-type (n = 3). **, *** = significativement différent des cellules contrôles non stimulées avec respectivement $p < 0,01$ et $p < 0,001$, comme déterminé par un test t de Student non pairé.

Cytotoxicité (%)	
0 μ M	4,0
20 μ M	2,2
50 μ M	2,3
100 μ M	2,1
150 μ M	1,6
200 μ M	25,4
etOH	3,6

Tableau 3.2 : Effet de l'antimycine A sur la viabilité cellulaire de fibroblastes contrôles, test LDH :

Des fibroblastes contrôles sont ensemencés dans des boîtes de culture à 24 puits à une densité de 23 000 cellules/puits. Le lendemain, les cellules ont atteint la confluence et sont incubées en présence (ou en absence) de concentrations croissantes en antimycine A (de 20 μ M à 200 μ M) diluée dans du milieu MEM complet pendant 24 h. Au terme de cette incubation, les surnageants sont placés sur glace dans des microtubes et centrifugés 5 min à 2000 rpm pour récupérer les cellules qui se seraient détachées (culots). Les surnageants sont ensuite transférés dans de nouveaux microtubes (surnageants), tandis que les culots sont resuspendus dans 250 μ l de PBS-Triton X-100 (10 %). Les tapis cellulaires sont également lysés (10 min sous une légère agitation rotative) en présence de 250 μ l de PBS-Triton X-100 (10 %). Les lysats sont alors récupérés sur glace dans des microtubes (lysats). Ensuite, dans une plaque 96 puits sont déposés séparément 100 μ l du culot resuspendu, 100 μ l de surnageant, 5 μ l du lysat dilué dans 95 μ l de PBS Triton X-100. Les blancs sont constitués de 100 μ l de milieu MEM complet représentant le blanc pour les échantillons "surnageants" ou 100 μ l de PBS-Triton X-100 représentant le blanc pour les échantillons "culots" et "lysats". On ajoute alors 100 μ l d'un mélange réactionnel LDH » à chacun des puits. L'absorbance est ensuite mesurée en cours de réaction toutes les 15 min (jusqu'à ce que le signal soit saturé) aux longueurs d'ondes 490 et 655 nm. Le pourcentage de cytotoxicité est ensuite calculé avec les valeurs de D.O. dans la zone de linéarité du test selon le protocole repris au point 2.16 du matériel et méthode. Les résultats sont exprimés en pourcentages de cytotoxicité comme la moyenne \pm 1 écart-type pour n = 4.

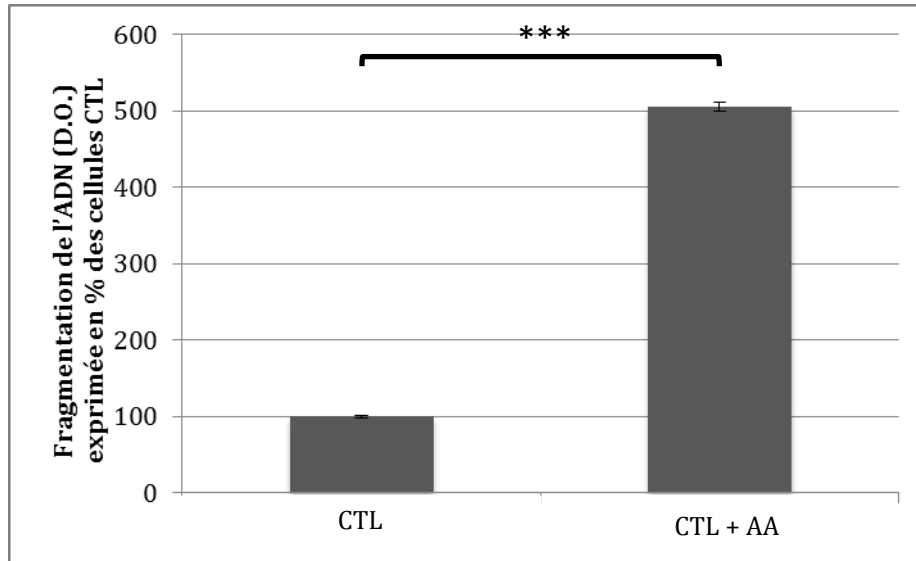


Figure 3.21 : Effet de l'antimycine A sur la fragmentation de l'ADN génomique

Des fibroblastes contrôles sont ensemencés dans des boîtes de culture à 24 puits à une densité de 23 000 cellules/puits. Le lendemain, les cellules sont rincées avec 1 ml de PBS et incubées en présence ou en absence (CTL) d'antimycine A à 200 μ M diluée dans du milieu MEM complet, pendant 24 h. Les milieux de culture sont alors prélevés dans des microtubes puis centrifugés à 2000 rpm pendant 3 min et à 4 °C, tandis qu'un volume de 150 μ l de tampon d'incubation est déposé sur le tapis cellulaire. Les culots de cellules sont ensuite resuspendus dans 100 μ l de tampon d'incubation et ajoutés aux tapis cellulaires. Au terme d'une incubation de 30 min, les solutions sont homogénéisées (à la pipette), puis centrifugées pendant 7 min à 13 000 rpm et à 4 °C. Le surnageant est récupéré et utilisé pour réaliser la mesure de la fragmentation de l'ADN génomique à l'aide du kit Cell Death. Pour ce faire, des anticorps anti-histones recouvrent les puits d'une plaque 96 puits dans lesquels sont ensuite ajoutés 100 μ l d'échantillons. Un anticorps secondaire dirigé contre l'ADN et couplé à une peroxydase est alors ajouté. Le substrat de l'enzyme (ABTS) est ensuite ajouté et le produit de la réaction permet de révéler l'activité de la peroxydase immobilisée dans les complexes immuns et donc l'abondance des nucléosomes initialement fixés. Les valeurs d'absorbance lues au spectrophotomètre à 405 nm sont ensuite exprimées en pourcentages de mortalité cellulaire par rapport au contrôle et représentent la moyenne \pm 1 écart type (n = 3). *** = significativement différent des cellules contrôles non stimulées, avec $p < 0,001$, comme déterminé par un test t de Student non pairé.

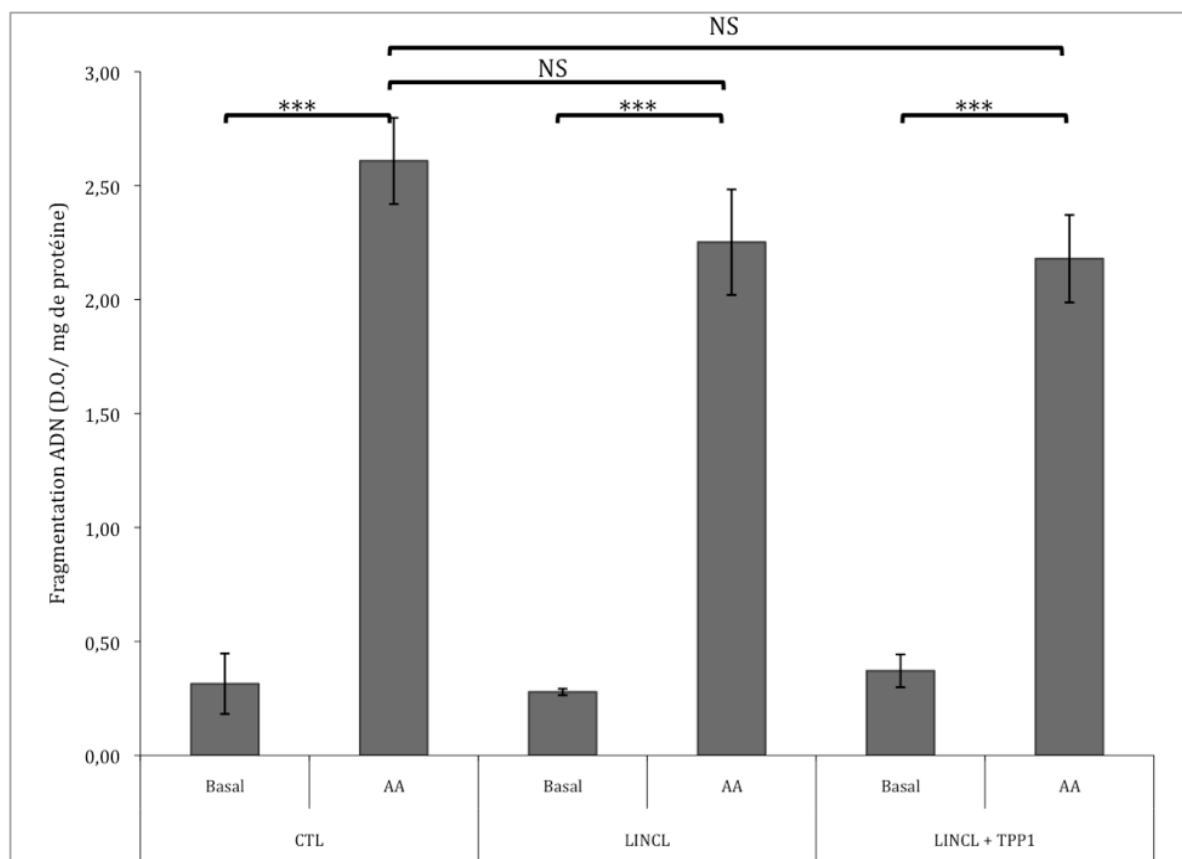


Figure 3.22 : Mesure de la fragmentation de l'ADN génomique dans les cellules CTL, LINCL et LINCL + TPP-1

Des fibroblastes CTL et LINCL sont ensemencés à une densité de 4 000 cellules/puits dans une boîte de culture à 24 puits. Dans la condition LINCL + TPP-1, les cellules ont été incubées en présence de la pro-enzyme TPP-1 pendant 48 h puis maintenues en culture pendant 4 jours dans du milieu sans enzyme. Au terme de ces 6 jours, les cellules CTL, LINCL et LINCL + TPP-1 sont rincées avec 1 ml de PBS et incubées en présence ou en absence d'antimycine A à 200 μ M diluée dans du milieu MEM complet, pendant 24 h. Les milieux de culture sont alors prélevés dans des microtubes puis centrifugés à 2000 rpm pendant 3 min et à 4 °C, tandis qu'un volume de 150 μ l de tampon d'incubation est déposé sur le tapis cellulaire. Les cellules sont ensuite resuspendues dans 100 μ l de tampon d'incubation et ajoutées aux tapis cellulaires. Au terme d'une incubation de 30 min, les solutions sont homogénéisées (à la pipette), puis centrifugées pendant 7 min à 13 000 rpm et à 4 °C. Le surnageant est récupéré et utilisé pour réaliser la mesure de la fragmentation de l'ADN génomique à l'aide du kit « Cell Death ». Pour ce faire, des anticorps anti-histones recouvrent les puits d'une plaque 96 puits dans lesquels sont ensuite ajoutés 100 μ l d'échantillons. Un anticorps secondaire dirigé contre l'ADN et couplé à une peroxydase est alors ajouté. Le substrat de l'enzyme (ABTS) est ensuite ajouté et le produit de la réaction permet de révéler l'activité de la peroxydase immobilisée dans les complexes immuns et donc l'abondance des nucléosomes initialement fixés. Les valeurs d'absorbance lues au spectrophotomètre à 405 nm sont ensuite exprimées en D.O./mg de protéines et représentent la moyenne \pm 1 écart type (n = 3). *** = significativement différent des cellules non stimulées, avec $p < 0,001$ comme déterminé par un test t de Student non païré. NS = non significativement différent des cellules CTL incubées avec de l'antimycine A à 200 μ M.

cellulaire. L'antimycine A, ayant la particularité d'inhiber le complexe III de la chaîne respiratoire mitochondriale, a été choisie comme permettant d'induire la mortalité cellulaire sur base du fait qu'elle affecte la bioénergétique d'un organite qui joue un rôle central dans la régulation de la survie et de la mort cellulaire par apoptose et nécrose [100,101]. Les tests de viabilité cellulaire (MTT) et de cytotoxicité (mesure du relargage de la LDH) ont été réalisés pour déterminer la concentration en antimycine A et le temps d'incubation nécessaires pour observer la mortalité cellulaire des fibroblastes CTL.

Les résultats de ces tests de mises au point sont présentés aux **Figures 3.19** et **3.20** et au **Tableau 3.2**. Pour choisir la concentration en antimycine A à utiliser afin d'induire la mort cellulaire, nous avons incubé des cellules CTL pendant 24 h en présence de concentrations croissantes en antimycine A allant de 20 à 200 μM . Le test de viabilité cellulaire repose sur la capacité des cellules métaboliquement actives à incorporer le MTT et à le réduire en formazan par l'action de la succinate déshydrogénase mitochondriale. Le formazan forme alors un précipité insoluble et de couleur mauve, dont la quantité est proportionnelle au nombre de cellules métaboliquement actives. Les résultats de ce test sont représentés à la Figure 3.20 et indiquent une viabilité cellulaire réduite des cellules après une incubation pendant 24 h en présence de concentrations en antimycine A de 150 et 200 μM .

Un deuxième test de cytotoxicité reposant sur le dosage de la LDH libérée dans le milieu extracellulaire suite à la perméabilisation de la membrane plasmique au cours de la mort cellulaire a ensuite été réalisé. L'activité de la LDH dans le milieu extracellulaire est alors mesurée et quantifiée par une méthode de dosage colorimétrique. Les résultats de ce test sont présentés au Tableau 3.2 et indiquent une cytotoxicité de la molécule après une incubation des cellules pendant 24 h en présence d'antimycine A à 200 μM .

Sur base de ces résultats, nous avons choisi une concentration de 200 μM en antimycine A pour induire la mortalité des cellules contrôles au cours d'une incubation de 24 h. Nous avons ensuite recherché l'effet de ce traitement sur la fragmentation inter-nucléosomale (**Figure 3.21**). Les résultats montrent que l'antimycine A, à cette concentration, est capable d'induire la fragmentation de l'ADN dans les cellules, et donc l'apoptose dans les cellules contrôles puisque le taux de fragmentation inter-nucléosomale de l'ADN est 5 fois plus important dans des cellules CTL incubées pendant 24 h en présence d'antimycine A à 200 μM que dans les cellules contrôles non traitées.

Afin de tenter de mettre en évidence une sensibilité différentielle des cellules LINCL à l'apoptose induite par l'antimycine A, la mesure de la fragmentation de l'ADN génomique a finalement été analysée dans des cellules CTL, LINCL et LINCL + TPP-1 pré-incubées ou non avec de l'antimycine A à 200 μM . Les résultats obtenus sont présentés à la **Figure 3.22**. Nous observons bien que la fragmentation de l'ADN est plus importante dans les cellules CTL, LINCL et LINCL + TPP-1 pré-incubées pendant 24 h en présence d'antimycine A 200 μM , mais nous n'observons pas d'effet de la déficience en TPP-1 sur la sensibilité des cellules à l'apoptose induite par l'antimycine A. Ce résultat suggère que, dans ces conditions expérimentales, la déficience en TPP-1 n'a pas d'effet sur la sensibilité de la mort cellulaire en réponse à une incubation en présence d'un inhibiteur de la chaîne respiratoire mitochondriale pendant 24 h.

Il serait intéressant de répéter cette expérience pour des incubations plus courtes (cinétiques) pour tenter de mettre une différence de sensibilité des cellules LINCL à l'apoptose induite.

4 Discussion, perspectives et conclusion

La LINCL est une maladie neurodégénérative causée par une mutation du gène *cln2* codant pour l'enzyme TPP-1. Actuellement, plus de 72 mutations ont été décrites comme induisant une déficience de l'activité enzymatique de la TPP-1, dont la mutation de transition $G \Rightarrow C$ précédant la T523, et la mutation non-sens $C \Rightarrow T$ à la position 636, provoquant l'apparition d'un codon stop [51,208]. Suite à cette déficience enzymatique s'observe une accumulation de céroïdes, un pigment auto-fluorescent, dans tous les tissus de l'organisme et particulièrement dans le cerveau, au niveau du cervelet et de l'hypothalamus. Les patients atteints de la LINCL souffrent de crises d'épilepsie, de dysfonctionnements moteurs, d'une perte progressive des fonctions mentales et cognitives, et meurent généralement avant l'âge de 14 ans [209]. Actuellement, peu d'informations sont connues concernant le lien existant entre les dommages lysosomiaux primaires et l'apparition de la pathologie.

Toutefois, il a été montré dans différentes LSDs que le dysfonctionnement lysosomal caractérisé par une accumulation de céroïdes ou de lipides (par exemple) peut mener à l'altération des activités et fonctions mitochondriales [43,61]. Ainsi dans la maladie de Batten, une LSD induite par une déficience en enzyme « Palmitoyl Delta-9 Désaturase », les mitochondries ont une capacité réduite à produire de l'ATP [61]. De plus dans la MLIV, caractérisée par la déficience du canal lysosomal ionique Mucolipin-1, le réseau mitochondrial est fragmenté et les mitochondries ont une capacité réduite à séquestrer le calcium en réponse à une augmentation de la concentration en calcium cytosolique [43]. Ces altérations sont généralement accompagnées d'une sensibilité accrue à l'apoptose.

Basé sur ces informations et connaissant le rôle essentiel des mitochondries dans la production d'ATP, dans la régulation de l'homéostasie du calcium, dans la production de ROS, dans la β -oxydation des acides gras et dans la régulation des signaux de survie et de mort cellulaire ; l'objectif principal de cette étude était de rechercher les effets potentiels d'une déficience en TPP-1 sur la population mitochondriale dans des fibroblastes LINCL.

Ce travail est la suite d'une étude réalisée préalablement au laboratoire dans laquelle il a été montré que la déficience en TPP-1 ne semble pas avoir d'effet sur l'abondance mitochondriale mais pourrait affecter la morphologie des mitochondries. De même, la déficience en TPP-1 semble induire une diminution de l'abondance de la sous-unité β de la F_0/F_1 ATPsynthase, alors que le contenu intracellulaire en ATP n'est pas diminué dans les cellules en réponses à la déficience en TPP-1 (Stéphane Demine, Mémoire 2010).

La plupart de ces résultats (abondance et morphologie mitochondriale et contenu intracellulaire en ATP) n'ayant pas été obtenus pour les fibroblastes LINCL pré-incubés avec la pro-enzyme TPP-1 recombinante, au début de ce travail, il était difficile de déterminer, avec certitude, si les différences observées entre les lignées CTL et LINCL étaient dues à la déficience en TPP-1 ou au contraire à une différence de « background » génétique des lignées cellulaires utilisées. Ainsi, nous nous sommes premièrement intéressés à confirmer ces résultats.

Rappelons que l'abondance mitochondriale au sein des cellules est le résultat d'un équilibre entre les événements de biogenèse mitochondriale et de mitophagie. Un dérèglement de cet équilibre, induisant une diminution ou une augmentation du nombre de mitochondries dans les cellules, est retrouvé dans différentes LSDs [60,210]. Par exemple, dans une étude réalisée sur la Cystinose Néphrophatique (une LSD causée par la mutation du gène codant pour la cystinosine et caractérisée par une atteinte du système rénal) la mitophagie est anormalement activée dans les fibroblastes de patients atteints de la maladie, induisant une diminution du nombre des mitochondries [210]. Inversement, un blocage de la mitophagie est

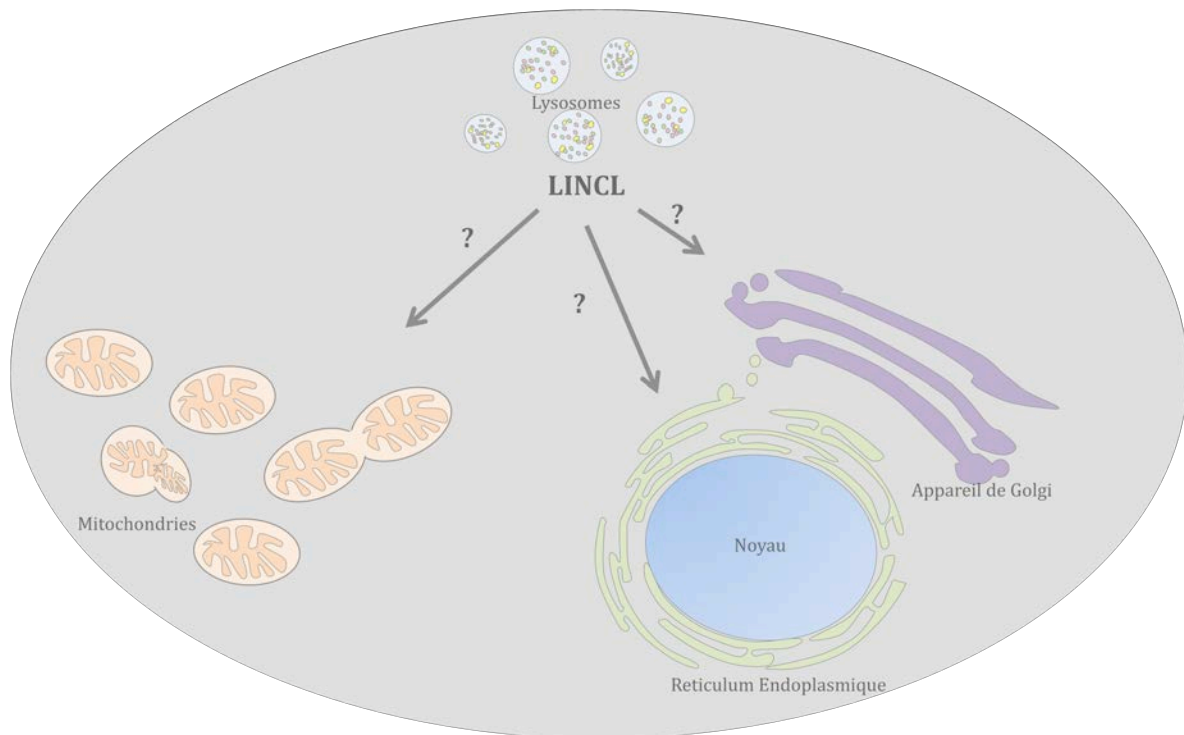


Figure 5.1. Effets éventuels d'une déficience en TPP-1 sur les différents organites cellulaires

observé dans la maladie d'Austin (Déficit Multiple en Sulfatase, DMS), provoquant une accumulation de mitochondries non fonctionnelles dans le cerveau de souris DMS [60]. Néanmoins, les résultats obtenus au cours de ce mémoire semblent indiquer que l'abondance mitochondriale n'est pas affectée par la déficience en TPP-1, suggérant que les mécanismes de biogenèse et de mitophagie ne sont pas altérés dans les cellules LINCL et dans nos conditions expérimentales. Pour confirmer ces résultats, il serait toutefois intéressant de mesurer l'abondance de l'ADNmt des fibroblastes CTL, LINCL et LINCL + TPP-1 par une approche RT-qPCR en temps réel. Pour ce faire, le nombre de copies d'un transcrit nucléaire et d'un transcrit mitochondrial devrait être analysé et le ratio ADNmt/ADNn obtenu permettrait de déterminer le contenu en ADNmt dans nos différentes conditions. De même, il pourrait être intéressant d'analyser l'abondance des régulateurs impliqués dans la biogenèse mitochondriale (PGC-1 α , NRF-1, NRF-2, ERR α et PPARs) par RT-qPCR en temps réel, Western Blot et systèmes rapporteurs, afin de vérifier si celle-ci n'est pas modifiée en réponse à la déficience en TPP-1. Une approche protéomique ciblée sur des mitoprotéomes des cellules LINCL et LINCL ayant récupéré une activité enzymatique pendant plusieurs jours permettrait également de mettre d'éventuels changements dans la composition protéique des mitochondries dans les cellules présentant un déficit en activité TPP-1.

Afin de continuer cette recherche, nous nous sommes ensuite intéressés au rôle potentiel d'une déficience en TPP-1 sur la morphologie du réseau mitochondrial et aux effets éventuels de cette déficience enzymatique sur les fonctions mitochondriales et sur l'expression de gènes codant pour des protéines mitochondriales. Les résultats obtenus au cours de ce mémoire ont permis de mettre en évidence une fragmentation plus forte du réseau mitochondrial dans les cellules LINCL.

Il est connu que plusieurs LSDs et maladies neurodégénératives sont associées à un dysfonctionnement des mécanismes de fusion et/ou de fission mitochondriales. Ainsi, outre la maladie de Batten et la MLIV, la morphologie mitochondriale de fibroblastes humains est également altérée dans la Mannosidose α , une LSD causée par une déficience en mannosidase- α et caractérisée par des retards mentaux et déformations du squelette [211]. Au vu de l'impact d'une dérégulation de la dynamique mitochondriale dans d'autres LSDs, nous nous sommes ensuite intéressés à l'étude des causes et effets potentiels de la fragmentation mitochondriale dans les cellules LINCL.

Nous nous sommes donc premièrement intéressés aux mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de la morphologie mitochondriale. Les mitochondries sont connues comme étant des organites très dynamiques pouvant adopter de nombreuses structures morphologiques [98,133]. La morphologie des mitochondries est de ce faite très changeante, et dépend des modifications résultants des cycles de fusion et fission. La fusion est connue pour promouvoir la production d'ATP à travers le maintien du potentiel de membrane, ainsi que la protection de l'ADN mitochondrial en assurant la complémentation des mitochondries non-fonctionnelles avec des portions de génomes fonctionnels des mitochondries présentes dans son voisinage [65,133]. La fission mitochondriale est quant à elle requise pour assurer la ségrégation des mitochondries dans les cellules filles lors de la mitose, et participe à la mitophagie en isolant les mitochondries non fonctionnelles [65]. La fission est également impliquée dans l'initiation de l'apoptose dans certaines conditions [133]. Ces processus sont régulés par l'activité de protéines spécifiques, à savoir MFN1, MFN2 et OPA1 qui sont requises pour les événements de fusion mitochondriale, tandis que FIS1 et DRP1 sont impliquées dans la régulation des phénomènes de fission [65,183].

Etant donné que la fragmentation mitochondriale est le résultat d'un déséquilibre entre les mécanismes de fusion et de fission, l'abondance des protéines MFN1, OPA1, DRP1 et FIS1 a été analysée dans les fibroblastes CTL, LINCL et LINCL + TPP-1. Les résultats

obtenus ont montrés que l'abondance de la protéine MFN1 semble diminuer dans les cellules LINCL comparée aux cellules CTL et cellules LINCL pré-incubées avec la pro-enzyme recombinante TPP-1, suggérant ainsi qu'une diminution des phénomènes de fusion pourraient être à la base de la fragmentation mitochondriale des cellules LINCL. Différentes données dans la littérature indiquent qu'une diminution de l'abondance des MFN1 et 2 peut mener à la fragmentation mitochondriale. Ainsi, une étude réalisée sur des cellules MEF MFN1^{-/-} et MEF MFN2^{-/-} a montré que les mitochondries de ces cellules sont fragmentées, avec un effet plus marqué de la fragmentation dans les cellules MFN1^{-/-} comparé aux cellules MEF MFN2^{-/-} [184].

Pour confirmer ces résultats, l'abondance des transcrits MFN1, OPA1, DRP1 et FIS1 a ensuite été analysée en RT-qPCR en temps réel. Bien que surprenants, ces résultats semblent indiquer que l'abondance des transcrits n'est pas modifiée entre les cellules CTL, LINCL et LINCL + TPP-1, suggérant ainsi que les différences de l'abondance protéique de la MFN1 seraient provoquées par des modifications post-traductionnelles. Par exemple, il est connu que l'ubiquitine ligase MARCH-V, en plus d'interagir avec DRP1 (recrutement en MME) et MFN2 (augmentation de l'activité GTPase) catalyse l'ubiquitination de la MFN1 pour médier sa dégradation par la voie du protéasome 26S [187]. Une modification de l'activité de MARCH-V en réponse à la déficience en TPP-1 pourrait par exemple expliquer la diminution de l'abondance de la MFN1 dans les cellules LINCL. L'étude de l'abondance de la protéine MARCH-V pourrait donc apporter des éclaircissements sur cette hypothèse. De même, nous pourrions utiliser des siRNA dirigés contre MARCH-V afin d'analyser les effets potentiels de l'inhibition de l'expression de cette protéine sur l'abondance de la MFN1 dans les cellules LINCL. Nous pourrions également analyser l'état d'ubiquitination de la protéine MFN1 par une approche en Western Blot à fluorescence au moyen d'anticorps dirigés contre l'ubiquitine, après avoir immunoprécipité la protéine MFN1 dans les différentes lignées cellulaires. Il serait également intéressant d'analyser l'abondance de la MFN2 et d'ainsi déterminer si l'abondance de la MFN2 est également modifiée dans les cellules présentant une déficience en TPP-1.

De plus, il est également connu que les fonctions des protéines FIS1 et DRP1 sont hautement régulées par modifications post-traductionnelles. De ce fait, même si des différences d'abondance de ces protéines n'ont pas été mises en évidence dans les cellules LINCL, il est possible que des modifications post-traductionnelles facilitent aussi le recrutement de DRP1 en MME alors que son abondance totale n'est pas modifiée. Par exemple, en plus de l'ubiquitination dépendante de MARCH-V, DRP1 peut être transloquée et stabilisée en MME par la sumoylation dépendante de SUMO-1 et par la phosphorylation de sa Ser600 par la CaMKI α [158,159].

Afin d'analyser l'effet potentiel d'une déficience en TPP-1 sur le recrutement de DRP1 au niveau de FIS1 en MME, la co-localisation éventuelle de ces deux protéines a été étudiée. Cependant, le logiciel Leica utilisé pour étudier la co-localisation de ces protéines n'a pas permis de mettre en évidence une différence dans le recrutement de la protéine DRP-1 par cette approche. Il serait donc nécessaire de réaliser des expériences de co-immunoprécipitation entre FIS1 et DRP1 suivie d'une séparation des protéines par gel électrophorèse pour estimer l'importance de l'interaction entre ces protéines (et donc du recrutement de DRP-1) dans les différentes lignées cellulaires et conditions expérimentales. Néanmoins, les résultats obtenus semblent indiquer que le recrutement de DRP1 par FIS1 en MME n'est pas modifié en réponse à une déficience en TPP-1, renforçant ainsi l'hypothèse selon laquelle une diminution des phénomènes de fusion pourrait être à la base de la fragmentation du réseau mitochondrial observé dans les cellules LINCL.

Différentes données dans la littérature indiquent que la fragmentation du réseau mitochondrial peut mener à l'altération de différentes fonctions de l'organite. Ainsi, nous nous sommes ensuite intéressés aux effets éventuels d'une déficience en TPP-1 sur différentes fonctions mitochondriales, à commencer par le rôle central des mitochondries dans la production d'énergie sous forme d'ATP. Une diminution de la production d'ATP a été observée dans les fibroblastes de patients atteints de la maladie de Fabry (déficience en α -galactosidase) en réponse à une diminution de l'activité des enzymes de la chaîne respiratoire mitochondriale. Bien que les mécanismes impliqués dans la diminution de l'activité de ces enzymes ne soient pas connus, la diminution d'ATP pourrait jouer un rôle essentiel dans la pathogenèse de la maladie de Fabry [213].

Etant donné que de l'abondance de la sous-unité β de la F_0/F_1 -ATP synthase semble diminuée dans la LINCL (Stéphane Demine, Mémoire 2010) et que la fragmentation du réseau mitochondrial est souvent associée à une diminution de la production d'ATP [188], nous avons quantifié le contenu en ATP intracellulaire dans les cellules CTL, LINCL et LINCL + TPP-1 pour déterminer si celui-ci est modifié en réponse à une déficience en TPP-1.

De manière surprenante, les résultats obtenus vont dans le sens d'une augmentation significative du contenu intracellulaire en ATP dans les cellules LINCL. Afin d'interpréter ces résultats, il est premièrement important de signaler que la mesure du contenu en ATP intracellulaire n'est pas nécessairement représentative de la production d'ATP dans les cellules. Ainsi, pour expliquer ces résultats, il serait par exemple intéressant de mesurer l'activité globale de la chaîne respiratoire dans les cellules CTL, LINCL et LINCL + TPP-1. Pour ce faire la consommation d'oxygène par la chaîne respiratoire pourrait être mesurée au moyen d'une électrode à oxygène (électrode de Clark) maintenue à 37 °C après avoir resuspendu les cellules dans un tampon de respiration à base de D-glucose [214]. De même, nous pourrions mesurer le rapport P/O (nombre de moles d'ATP synthétisées/nombre de moles d'oxygène consommées) et le RCR (Respiratory Control Ratio) [215]. Ce dernier se mesure sur des mitochondries isolées et caractérise le rapport entre la pente mesurée après ajout d'ADP à la suspension mitochondriale sur la pente mesurée après l'épuisement d'ADP.

Si une diminution de la capacité des mitochondries à produire de l'ATP était observée dans les cellules LINCL, l'augmentation du contenu intracellulaire en ATP dans les fibroblastes déficients en TPP-1 pourrait alors s'expliquer par une compensation de la diminution de la production d'ATP au moyen d'autres mécanismes comme la glycolyse. Cependant, cette hypothèse est probablement à écarter étant donné qu'un changement d'acidité du milieu de culture n'a pas été observé dans les conditions LINCL (pas de changement de l'indicateur phénol du milieu de culture), reflétant la libération de molécules acides (acide lactique) au cours la conversion du pyruvate en lactate libéré dans le milieu extracellulaire.

Une diminution/un ralentissement de l'utilisation de l'ATP dans les cellules LINCL pourrait également expliquer cette « augmentation » du contenu intracellulaire en ATP. Au cours de cette étude, il a été observé que les cellules LINCL ont tendance à proliférer moins rapidement que les fibroblastes CTL et LINCL pré-incubés avec la pro-enzyme recombinante TPP-1. Bien que ces résultats n'aient pas été analysés de manière expérimentale (mais sont basés sur des observations au microscope en cours de culture) et devraient être confirmés (en étudiant par exemple la prolifération cellulaire au cours du temps), il est possible que la demande en ATP soit moins importante dans les cellules LINCL, expliquant ainsi la diminution de la consommation d'ATP dans ces cellules.

Les résultats obtenus par la suite semblent indiquer que le potentiel de membrane mitochondriale est sensible à la déficience en TPP-1 étant donné qu'une augmentation de celui-ci est observée dans les cellules LINCL où l'activité enzymatique de la TPP-1 a été

restaurée comparé aux fibroblastes LINCL. Le potentiel de membrane est essentiel à la survie cellulaire et caractérise la force protomotrice nécessaire à la production d'ATP [190]. Il est également impliqué dans le transport de protéines à destination de la mitochondrie et à la régulation de l'homéostasie du calcium [56,190]. Une altération du potentiel de membrane peut donc être néfaste pour les cellules. Par exemple, une diminution du potentiel de membrane a été observée dans la maladie de Niemann Pick de type C 1 (NPC1). En effet, une étude réalisée sur des souris NPC1 a montré que l'accumulation de cholestérol dans les membranes mitochondriales altère le potentiel de membrane mitochondrial et s'accompagne d'une diminution de la production d'ATP dans les neurones de ces souris [62]. Par ailleurs, une étude portée sur la maladie de Parkinson a mis en évidence une altération du potentiel de membrane mitochondriale accompagnée d'une fragmentation des mitochondries dans les fibroblastes de patients atteints de la maladie [218]. Ainsi, le potentiel de membrane plus faible observé dans les LINCL (par rapport aux cellules LINCL + TPP-1) pourrait être associé à la fragmentation du réseau mitochondrial des cellules LINCL.

Toutefois, les résultats obtenus sont difficiles à interpréter étant donné que les valeurs associées aux fibroblastes CTL sont surprenantes et contradictoires comparés aux résultats des cellules LINCL + TPP-1 (le « bon CTL »). Ces résultats semblent indiquer une hyperpolarisation du potentiel de membrane dans les conditions LINCL et LINCL + TPP-1 comparés à la situation CTL.

Différentes études ont montré une hyperpolarisation du potentiel de membrane mitochondriale en réponse à un stress cellulaire [219]. Par exemple, des incubations de courtes durées de neurones en culture en absence d'oxygène et de glucose conduisent à l'hyperpolarisation du potentiel de membrane mitochondriale, tandis que des incubations prolongées induisent une dépolarisation suivie de la mort cellulaire [219]. De même, l'hyperpolarisation du potentiel de membrane mitochondriale a été observée en réponse à une stimulation des neurones de souris à la staurosporine (un inhibiteur de kinases) [220]. Une hyperpolarisation du potentiel de membrane est, de ce fait, induite en réponse à un stress toxique (camptothécine, staurosporine, privation en glucose et oxygène notamment) et caractériserait un état intermédiaire entre la survie et la mort cellulaire [219]. L'hyperpolarisation du potentiel de membrane est également observée dans certaines conditions pathologiques comme dans le cas du diabète et de l'obésité en réponse à l'hyperglycémie [197]. Comme expliqué précédemment, celle-ci pourrait aussi être le résultat d'une augmentation de l'activité de la chaîne respiratoire en réponse à une augmentation de la production de pyruvate dans les cellules et une légère élévation de la concentration en calcium matriciel.

L'hyperpolarisation peut également être associée à une augmentation de la prise de glucose par les cellules et une augmentation de la concentration en calcium dans les mitochondries, ainsi qu'à une meilleure disponibilité du NADPH et à une augmentation des niveaux d'ATP [221]. Bien que le contenu en ATP intracellulaire soit plus élevé dans les fibroblastes LINCL comparé aux fibroblastes CTL, pouvant ainsi expliquer l'hyperpolarisation du potentiel de membrane dans ces conditions, le contenu en ATP est significativement diminué dans les cellules LINCL + TPP-1 tandis que le potentiel de membrane est encore plus élevé dans ces conditions.

Comme nous l'avons montré, la concentration en calcium à l'état basal est plus élevée dans les mitochondries de cellules LINCL. La prise de calcium par les mitochondries est dépendante du potentiel de membrane mitochondriale et une dépolarisation de la mitochondrie inhibe l'entrée de calcium dans la mitochondrie [198]. L'hyperpolarisation du potentiel de membrane dans les cellules LINCL peut donc corrélée à l'augmentation de la concentration en calcium dans les mitochondries. Néanmoins, ce résultat n'est pas confirmé

pour les cellules LINCL + TPP-1 où la concentration en calcium est diminuée comparée aux cellules LINCL.

Toutefois, la sonde TMRE n'étant pas ratiométrique, il est possible que le chargement en sonde ait différé entre les différentes lignées cellulaires et conditions testées, expliquant ainsi les résultats obtenus. De ce fait, l'expérience de mesure du potentiel de membrane devra être reproduite en utilisant la sonde ratiométrique JC-1, permettant de mesurer le potentiel de membrane mitochondrial d'une manière indépendante de la charge en sonde [198].

Au vu du rôle du calcium dans l'induction de l'apoptose et dans la régulation de différentes fonctions mitochondriales au moyen de la phosphorylation et déphosphorylation de protéines, sa concentration intracellulaire doit être finement régulée [98]. L'entrée de calcium par la mitochondrie est régulée par le potentiel de membrane de part et d'autre de la MMI (-180 mV, négatif à l'intérieur) et requière la participation de deux transporteurs distincts [56]. Pour commencer, le VDAC assure le flux de calcium depuis le cytosol vers l'espace inter-membranaire. Le calcium est ensuite transporté dans la matrice mitochondriale via l'uniport lorsque la concentration cytosolique est supérieure à 200-300 nM [96]. Toutefois, les mitochondries doivent se trouver à proximité (10 à 30 nm) des sources de calcium (RE/membrane plasmique) pour pouvoir directement internaliser le calcium [222]. La sortie du calcium depuis les mitochondries vers la matrice est assurée par deux mécanismes distincts, l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ couplé à l'échangeur Na^+/H^+ , et l'échangeur $2\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ [56].

Etant donné que la mitochondrie joue un rôle essentiel dans la régulation de l'homéostasie du calcium, nous nous sommes intéressés aux effets potentiels d'une déficience en TPP-1 sur la capacité des mitochondries à tamponner une augmentation de la concentration en calcium cytosolique libre induite par une stimulation à l'ionomycine. De manière étonnante, les mitochondries des patients LINCL ne montrent pas de différence dans la capacité à tamponner une augmentation de la concentration calcique cytosolique par rapport aux mitochondries de cellules CTL et LINCL + TPP-1. Néanmoins, l'abondance du calcium dans les mitochondries LINCL à l'état basal est légèrement plus élevée que dans les mitochondries de cellules CTL et LINCL + TPP-1. Afin d'expliquer cette différence, il serait intéressant de mesurer la concentration en calcium dans le cytosol et au sein du RE dans ces fibroblastes.

Le RE possède plusieurs transporteurs du calcium dont le récepteur Inositol triphosphate (IP3R) [223], le récepteur Ryanodine [57], et les pompes du réticulum SERCA [223]. Les récepteurs IP3 sont des glycoprotéines localisées dans la membrane du RE et facilitent la sortie du calcium depuis le RE vers le cytosol ou les mitochondries, après avoir été activés par l'IP3. Dans la gangliosidose à GM1, une LSD caractérisée par une déficience en β -galactosidase, l'accumulation de GM1 au niveau des MAMs, conduit à une modification de l'efflux de calcium entre les deux organites [99]. Les MAMs caractérisent les sites où les mitochondries et le RE sont physiquement liés dans le but de réguler le flux de calcium, et sont associées à différentes protéines dont l'IP3R, la protéine régulatrice du glucose 75 (grp75) (une chaperonne moléculaire qui relie l'IP3R au VDAC), et la MFN2. En fait, l'accumulation de GM1 affecte les niveaux d'IP3R, VDAC et grp75, et augmente le nombre de contacts entre le RE et la mitochondrie, induisant une augmentation de l'entrée de calcium au sein des mitochondries [99]. De plus, l'activité de IP3R est connue pour être augmentée au niveau des neurones de la plupart des patients atteints de maladies neurodégénératives associées à l'âge, induisant une augmentation de la concentration en calcium dans le cytosol et dans les mitochondries [224].

D'autre part, la pompe SERCA est impliquée dans la réinternalisation du calcium cytosolique par le RE [225]. En réponse à une diminution de l'activité de SERCA, ainsi qu'en réponse à une augmentation de la libération du calcium depuis le RE, une augmentation de la

concentration calcique cytosolique est observée, menant à une augmentation de la prise de calcium par les mitochondries [226]. Plusieurs LSDs, telles que la maladie de Sandhoff (une maladie neurodégénérative caractérisée par une déficience en β -hexosaminidases A et B) sont caractérisées par l'accumulation de gangliosides et par l'inhibition des pompes SERCA, menant à une modification des concentrations en calcium cytosolique et mitochondrial [227,228]. De même, dans des souris KO mutées pour le gène *cln1* (codant normalement pour une PPT-1 active et caractéristique de la forme infantile de la NCL), la surcharge lysosomale génère un stress au niveau du RE conduisant à la libération de Ca^{2+} par l'organite [229].

Les mitochondries sont également impliquées dans la production de ROS, et ceux-ci participent à l'initiation de différentes voies de signalisation cellulaires telles que les voies JAK/STATs et MAP kinase [87,88]. Cependant, une augmentation de la concentration en ROS dans la cellule peut mener à des dommages cellulaires, voir à la mort cellulaire comme démontré dans plusieurs LSDs [41]. Par exemple, les fibroblastes de patients atteints de la maladie de Niemann Pick de type C présentent des niveaux élevés en ROS et les cellules de ces patients montrent une sensibilité accrue à l'apoptose comparée à des fibroblastes d'individus sains [41]. Ainsi, afin de déterminer les effets éventuels d'une déficience en TPP-1 sur la production de ROS mitochondriaux dans les fibroblastes LINCL, la sonde fluorescente MitoSOXTM Red (spécifique des anions superoxydes) a été utilisée.

Les résultats obtenus indiquent que l'abondance en O_2^- n'est pas modifiée entre les conditions CTL et LINCL, néanmoins, la présence de la TPP-1 semble diminuer faiblement l'accumulation des anions superoxydes dans ces cellules. De même, les fibroblastes CTL et LINCL répondent de manière similaire à une stimulation à l'antimycine A, tandis que la pré-incubation de la TPP-1 semble modifier la réponse mitochondriale à cette stimulation. Toutefois, il est possible que la pré-incubation des cellules avec la pro-enzyme TPP-1 recombinante ait affecté le chargement en sonde dans ces cellules, expliquant ainsi les différences observées. L'expérience pourrait être recommencée en utilisant la sonde ratiométrique mito-Ro-GFP, également spécifique des ROS mitochondriaux afin de vérifier ces données [203].

Il pourrait également être intéressant d'étudier les effets éventuels d'une déficience en TPP-1 sur l'abondance intracellulaire totale des ROS dans les cellules LINCL. La sonde H2-DCF-DA (dihydrodichlorofluorescein diacetate) pourrait ainsi être utilisée pour mesurer l'abondance des ROS dans les cellules CTL, LINCL et LINCL + TPP-1 [198]. Si une différence d'abondance des ROS est toujours observée entre les conditions LINCL et LINCL + TPP-1, il serait alors intéressant de s'attarder sur l'impact de ce stress oxydatif dans la pathogenèse de la LINCL.

Par la suite, nous nous sommes intéressés aux effets éventuels d'une déficience en TPP-1 sur l'expression de gènes codant pour certaines protéines mitochondriales. L'analyse des PCR-Arrays a montré que l'expression d'une vingtaine de gènes semblait être affectée par la restauration de l'activité enzymatique TPP-1 dans les fibroblastes LINCL par rapport aux cellules LINCL. Les résultats obtenus lors des PCR-Arrays indiquent également que l'abondance des transcrits des MFN1, MFN2, OPA1, DRP1 et FIS1 n'est pas modifiée, confirmant les résultats obtenus préalablement en RT-qPCR.

Afin de confirmer les résultats des PCR-Arrays, l'abondance des transcrits PUMA, Bnip3, SOD, ATP5G3, Cox6C, LHPP et SDHC a ensuite été analysée sur 3 cultures différentes de cellules CTL, LINCL et LINCL + TPP-1 par RT-qPCR en temps réel. De manière surprenante, seuls les résultats obtenus pour Bnip3 ont été confirmés, indiquant une surexpression de ce transcrit dans les cellules LINCL.

Pour expliquer la « non-confirimation » des résultats des PCR-Arrays, signalons premièrement que certains candidats qui semblaient différenciellement exprimés présentent des variations assez faibles et pourraient être le résultat d'un bruit de fond dans l'expression génique entre les conditions. Par ailleurs, les échantillons utilisés pour la réalisation des PCR-Arrays et des RT-qPCR sont différents et prennent donc en compte une éventuelle dérive cellulaire et variations entre cultures cellulaires. Il aurait été intéressant/nécessaire de réaliser la validation des résultats des PCR Arrays en RT-qPCR en temps réel en utilisant les mêmes échantillons.

Néanmoins, après avoir confirmé les résultats obtenus pour Bnip3 au niveau protéique, nous nous sommes intéressés à la caractérisation de la protéine.

La protéine Bnip3 est une protéine BH3-only recrutée en MME et en membrane du RE. Elle possède un domaine 3 d'homologie à Bcl-2 (BH3) (permettant l'interaction de la protéine avec d'autres membres de la famille Bcl-2, tels que Bcl-2 lui-même et Bcl-XL [105]), un domaine transmembranaire du côté C-terminal (nécessaire à l'activité pro-apoptotique et assure la localisation et la dimérisation de la protéine en membrane mitochondriale), et un domaine N-terminal orienté vers le cytoplasme (senseur redox) [103,104].

En réponse à un stress cellulaire, tel que l'ischémie et l'hypoxie, les protéines Bnip3 forment des homodimères stables au niveau de la MME [89]. Les protéines Bnip3 peuvent alors prendre part à l'induction de la mort cellulaire en activant les protéines Bax et Bak et le mPTP ou, dans certains cas, à la survie cellulaire en activant la mitophagie des mitochondries non fonctionnelles [102,105,120]. Le rôle de Bnip3 dans la mort et la survie cellulaire reste à ce jour très étudié et discuté, et semblerait être dépendant du type cellulaire et de la nature du stress rencontré.

Actuellement, différents facteurs de transcription ont été associés à la régulation de l'expression du gène codant pour Bnip3. Ainsi, HIF-1, FoxO3, PLAGL2 et E2F4 activent l'expression de Bnip3 tandis que NFκB, p53 et E2F1 régulent négativement l'expression de la protéine [105]. Le facteur HIF-1 étant le plus connu pour induire l'expression du gène codant pour Bnip3, nous nous sommes premièrement intéressés à la caractérisation de ce facteur, afin de déterminer si la déficience en TPP-1 a un effet sur son activité. Le facteur HIF-1 est généralement connu pour être activé en conditions hypoxiques toutefois, la présence de métaux (cobalt, nickel et cuivre notamment) peut également induire l'activation du facteur HIF-1 [204,205], tout comme l'activation des cellules par des cytokines comme le TGF-β [206]. Etant donné que la LINCL est caractérisée par une accumulation de céroïdes, composés entre autre de métaux comme le fer et le cuivre, il était envisageable d'observer une augmentation de l'activité de HIF-1, même dans des conditions non hypoxiques.

Néanmoins, les résultats obtenus semblent indiquer que le facteur de transcription HIF-1 n'est pas impliqué dans la surexpression de la protéine Bnip3 dans nos conditions. De ce fait, d'autres facteurs vont devoir être testés afin de déterminer celui à la base de l'augmentation de l'expression de Bnip3 dans les fibroblastes LINCL. Une étude récente réalisée sur des souris p53^{-/-} dans le but de déterminer le rôle éventuel de ce facteur pro-apoptotique dans la dégénérescence des cellules neurales dans la LINCL a montré que celle-ci n'est pas atténuée par la déficience de la protéine p53 [232]. Cette étude suggère que d'autres voies de signalisation prennent part à la neurodégénérescence observée dans la LINCL. L'étude de ce candidat n'est donc pas à privilégier.

Même si une surexpression de l'abondance de Bnip3 n'a pas encore été associée aux LSDs, les modulations de l'expression de cette protéine sont souvent associées à la pathogenèse de maladies comme le cancer, les troubles cardiovasculaires, l'arthrite

rhumatoïde et la maladie d'Alzheimer [105]. Par exemple, dans les cancers du sein et du poumon, la surexpression de la protéine Bnip3 participe au développement et à l'agressivité de la tumeur. En fait, dans le cancer et les tumeurs solides, la situation hypoxique stimulerait à la fois Bnip3 qui est impliquée dans les phénomènes de mort cellulaire et des facteurs de survie comme le VEGF (vascular endothelial growth factor) et le bFGF (basic fibroblasts growth factor), qui inhiberaient l'activité de Bnip3. On pense que la surexpression simultanée de ces différents activateurs et inhibiteurs de mort cellulaire permet la sélection sélective de tumeurs agressives pouvant échapper aux signaux de mort cellulaire [233]. Inversement dans le cancer du pancréas, Bnip3 joue un rôle suppresseur de tumeur et c'est son inhibition qui favorise la progression du cancer [234]. La surexpression de Bnip3 est également impliquée dans les maladies cardiovasculaires, dont l'infarct du myocarde [104]. La maladie d'Alzheimer est quant à elle caractérisée par l'accumulation de peptides A β dans le système nerveux. Ceux-ci sont toxiques pour les neurones et favorisent leur dégénérescence et regroupement en plaques séniles. En fait, l'accumulation de A β au sein du cerveau génère un stress oxydatif et celui-ci est à la base de la surexpression de Bnip3 et de la mort des neurones [235].

Au vu de l'implication d'une surexpression de la protéine dans différentes pathologies, il est envisageable que cette protéine pro-apoptotique soit également impliquée (positivement ou non) dans la pathogenèse de la LINCL. La plupart des données dans la littérature relatent la participation de Bnip3 dans l'induction de la mort cellulaire par apoptose et nécrose, mais également dans les phénomènes de survie cellulaire [105]. Ainsi, nous nous sommes finalement intéressés aux effets éventuels d'une déficience en TPP-1 (et donc d'une surexpression de Bnip3) dans les cellules LINCL sur l'initiation de l'apoptose. Celle-ci a été mesurée après avoir mis en place un système permettant d'étudier l'apoptose dans nos conditions expérimentales après une incubation des cellules pendant 24 heures en présence d'une molécule toxique comme l'antimycine A. Les résultats obtenus semblent indiquer que, dans ces conditions, bien que l'antimycine A induise l'apoptose dans les lignées cellulaires étudiées (mesurée par la fragmentation de l'ADN), il n'y a pas de sensibilité différentielle des cellules LINCL par rapport aux cellules contrôles incubées en présence de l'inhibiteur du complexe III de la chaîne respiratoire.

Cependant, il est possible qu'au temps 24 heures, la mortalité cellulaire ait atteint un « plateau d'apoptose » ne permettant pas de mettre en évidence une induction différentielle de l'apoptose entre les différentes conditions. Il serait de ce fait intéressant de recommencer cette expérience en incubant les cellules CTL, LINCL et LINCL + TPP-1 en présence d'antimycine A pendant des temps plus courts et d'ainsi vérifier l'impact éventuel de la déficience en TPP-1 (et la surexpression de Bnip3) sur la sensibilité de l'apoptose induite par l'antimycine A. La protéine Bnip3 étant impliquée dans les phénomènes de mort et/ou de survie cellulaire, sa surexpression pourrait ainsi accélérer ou au contraire ralentir l'induction de l'apoptose dans les cellules LINCL incubées en présence de l'inhibiteur pharmacologique de la respiration mitochondriale.

Il a également été montré dans plusieurs études que la protéine Bnip3 est impliquée dans les phénomènes de fission mitochondriale et participe ainsi à la régulation de la morphologie mitochondriale [130,131]. En effet, la protéine favoriserait la translocation de Drp1 et la stabilisation de PINK1 en MME, stimulant ainsi les phénomènes de fission [130,131]. Il serait donc très intéressant, dans le futur, d'étudier les effets potentiels du silençage de l'expression de Bnip3 sur la fragmentation du réseau mitochondrial observée dans les cellules LINCL. Les conditions d'invalidation (knock down) de l'expression du gène codant pour Bnip3 à l'aide de siRNA ont été mises au point dans le cadre de ce travail (résultats non montrés). Il serait donc intéressant d'étudier la morphologie du réseau

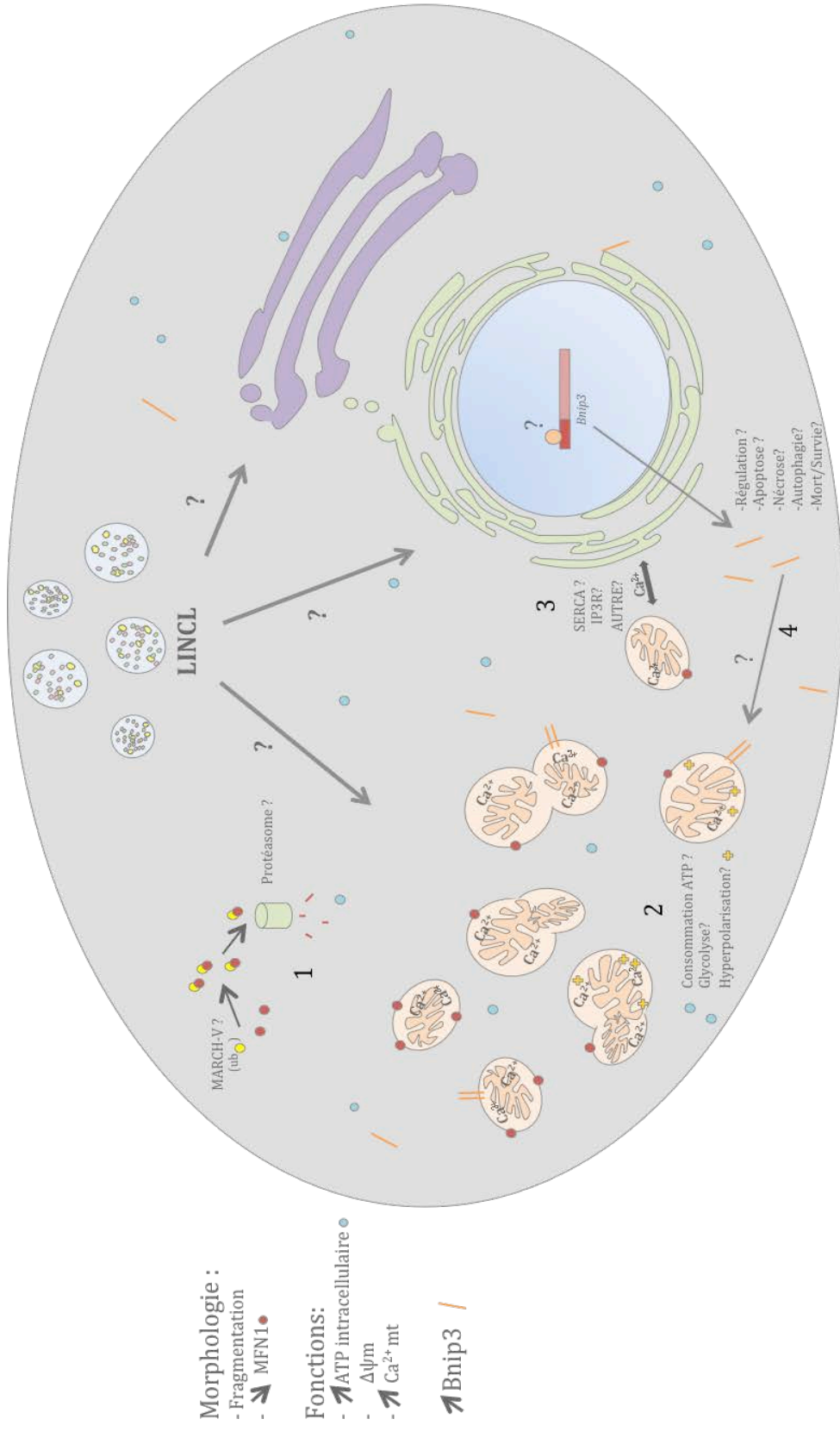


Figure 5.2 Effets potentiels d'une déficience en TPP-1 sur la population mitochondriale des cellules LINCL:

1. La fragmentation du réseau mitochondrial est observée dans les cellules LINCL. Celle-ci s'accompagne d'une diminution de l'abondance de la MFN1, impliquée dans les phénomènes de fusion mitochondriale. Il est possible que MARCH-V ubiquitine spécifiquement la MFN1 pour médier sa dégradation par la voie du protéasome.
2. Les cellules LINCL ont un contenu en ATP intracellulaire augmenté et un potentiel de membrane mitochondriale modifié. Ceci peut résulter d'une diminution de la consommation d'ATP par la cellule ou d'une compensation de la production en ATP par d'autres mécanismes (glycolyse?). L'hyperpolarisation de la membrane mitochondriale pourrait également expliquer ce phénomène
3. La concentration du calcium mitochondrial matriciel est augmentée dans les cellules LINCL, pouvant résulter d'une modification de l'habilité du Réticulum Endoplasmique à réguler le calcium
4. La protéine Bnip3 est surexprimée dans les cellules LINCL. Son ancrage en membrane mitochondriale et son rôle dans la pathologie doivent encore être déterminés.

mitochondrial dans des cellules LINCL dans lesquelles l'expression de Bnip3 est inhibée et dans les cellules LINCL + TPP-1 qui surexprimeraient la protéine.

Pour devenir active, la protéine Bnip3 doit s'ancrer en MME de manière covalente et former des homodimères. Il est de ce fait possible que, même si la protéine est surexprimée dans les fibroblastes LINCL, celle-ci ne soit pas intégrée en MME et présente sous la forme de dimères [105]. Il serait donc aussi intéressant d'analyser la stabilisation de Bnip3 en MME dans les cellules LINCL comparé aux cellules LINCL et LINCL + TPP-1. Une façon d'étudier le recrutement de Bnip3 en MME est de soumettre les mitochondries à une hydrolyse alcaline qui a la particularité de dissocier et d'hydrolyser les protéines non-intégrées en membrane mitochondriale. Après l'extraction, l'abondance des protéines Bnip3 intégrées en MME dans les cellules CTL, LINCL et LINCL + TPP-1 sera alors analysée et quantifiée par Western Blot en fluorescence [236].

Puisqu'il est également connu que la dimérisation de Bnip3 est activée en réponse à un stress, tel que l'hypoxie et l'augmentation de l'abondance des ROS, par exemple [105,108], il serait également intéressant de faire ces expériences en induisant un stress cellulaire (en incubant les cellules en présence d'antimycine A par exemple) et d'étudier l'état de fragmentation du réseau mitochondrial dans ces conditions.

Pour terminer, il serait intéressant/nécessaire de confirmer les résultats obtenus au cours de ce mémoire sur des modèles cellulaires mieux adaptés à l'étude de la pathologie, tels que des souris *cln2^{-/-}*. En effet, le modèle cellulaire utilisé au cours de ce mémoire présentent des lacunes car, dans un premier temps, il n'est pas certain que la restauration de la pro-enzyme recombinante TPP-1 permette de retrouver un phénotype normal/sain des cellules LINCL pour toutes les modifications éventuellement retrouvées. En effet, il est possible que certains dommages/changements cellulaires causés par la surcharge lysosomale ne soient pas « réversibles » par la restauration d'une TPP-1 active. Deuxièmement, il est connu que la pathologie LINCL affecte principalement les cellules neurales car celles-ci ne se régénèrent que très peu [52]. Il est de ce fait possible que les résultats obtenus sur la lignée fibroblastique ne soient pas représentatifs des effets d'une déficience en TPP-1 sur la lignée neuronale. L'utilisation d'un modèle cellulaire mieux adapté permettrait d'améliorer/finaliser la caractérisation de la LINCL, et de mieux comprendre les mécanismes moléculaires qui lui sont associés.

En résumé, nous pouvons dire que la déficience en TPP-1 semble induire la fragmentation du réseau mitochondrial des cellules LINCL. Nos résultats suggèrent que l'abondance de la protéine MFN1, normalement impliquée dans les phénomènes de fusion mitochondriale, est diminuée en réponse à la déficience enzymatique, et serait probablement impliquée dans la fragmentation des mitochondries des cellules LINCL. L'impact de cette fragmentation sur les activités mitochondriales reste peu compris. Toutefois, il semblerait que la concentration du calcium mitochondrial à l'état basal dans les cellules LINCL, ainsi que le potentiel de membrane et le contenu intracellulaire en ATP soient affectés par la déficience en TPP-1.

Nos résultats ont également montré que l'abondance de la protéine Bnip3 est augmentée dans les cellules LINCL. Cette protéine pro-apoptotique peut participer aux phénomènes de mort et de survie cellulaire et est associée à la pathogenèse de différentes maladies présentant des similitudes avec la LINCL (neurodégénérescence). Ainsi, dans le futur, le rôle et la fonction de Bnip3 dans la pathogenèse de la LINCL devront encore être caractérisés.

5 Bibliographie

1. de Duve C (2005) The lysosome turns fifty. *Nat Cell Biol* 7: 847-849.
2. Matteoni R, Kreis TE (1987) Translocation and clustering of endosomes and lysosomes depends on microtubules. *J Cell Biol* 105: 1253-1265.
3. Saftig P, Klumperman J (2009) Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 623-635.
4. Luzio JP, Rous BA, Bright NA, Pryor PR, Mullock BM, et al. (2000) Lysosome-endosome fusion and lysosome biogenesis. *J Cell Sci* 113 (Pt 9): 1515-1524.
5. Eskelinen EL (2006) Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Mol Aspects Med* 27: 495-502.
6. Eskelinen EL, Schmidt CK, Neu S, Willenborg M, Fuertes G, et al. (2004) Disturbed cholesterol traffic but normal proteolytic function in LAMP-1/LAMP-2 double-deficient fibroblasts. *Mol Biol Cell* 15: 3132-3145.
7. Diccio JE, Steinberg BE (2011) Lysosomal pH and analysis of the counter ion pathways that support acidification. *J Gen Physiol* 137: 385-390.
8. Saftig P (2006) Physiology of the lysosome.
9. Doray B, Ghosh P, Griffith J, Geuze HJ, Kornfeld S (2002) Cooperation of GGAs and AP-1 in packaging MPRs at the trans-Golgi network. *Science* 297: 1700-1703.
10. Braulke T, Bonifacino JS (2009) Sorting of lysosomal proteins. *Biochim Biophys Acta* 1793: 605-614.
11. H Lodish ABPM, C A Kaiser, J Darnell (2005) Trafic vésiculaire, sécrétion et endocytose. *Biologie moléculaire de la cellule Chapitre 17*.
12. Luzio JP, Poupon V, Lindsay MR, Mullock BM, Piper RC, et al. (2003) Membrane dynamics and the biogenesis of lysosomes. *Mol Membr Biol* 20: 141-154.
13. Sardiello M, Palmieri M, di Ronza A, Medina DL, Valenza M, et al. (2009) A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. *Science* 325: 473-477.
14. Pena-Llopis S, Vega-Rubin-de-Celis S, Schwartz JC, Wolff NC, Tran TA, et al. (2011) Regulation of TFEB and V-ATPases by mTORC1. *EMBO J* 30: 3242-3258.
15. Settembre C, Di Malta C, Polito VA, Garcia Arencibia M, Vetrini F, et al. (2011) TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis. *Science* 332: 1429-1433.
16. Eskelinen EL, Illert AL, Tanaka Y, Schwarzmans G, Blanz J, et al. (2002) Role of LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Mol Biol Cell* 13: 3355-3368.
17. Ciechanover A (2005) Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 79-87.
18. Stromhaug PE, Klionsky DJ (2001) Approaching the molecular mechanism of autophagy. *Traffic* 2: 524-531.
19. Hailey DW, Rambold AS, Satpute-Krishnan P, Mitra K, Sougrat R, et al. (2010) Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell* 141: 656-667.
20. Marino G, Lopez-Otin C (2004) Autophagy: molecular mechanisms, physiological functions and relevance in human pathology. *Cell Mol Life Sci* 61: 1439-1454.
21. Youle RJ, Narendra DP (2011) Mechanisms of mitophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12: 9-14.

22. Tasdemir E, Maiuri MC, Tajeddine N, Vitale I, Criollo A, et al. (2007) Cell cycle-dependent induction of autophagy, mitophagy and reticulophagy. *Cell Cycle* 6: 2263-2267.
23. Ouimet M, Franklin V, Mak E, Liao X, Tabas I, et al. (2011) Autophagy regulates cholesterol efflux from macrophage foam cells via lysosomal acid lipase. *Cell Metab* 13: 655-667.
24. Majeski AE, Dice JF (2004) Mechanisms of chaperone-mediated autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 36: 2435-2444.
25. Schneider L, Zhang J (2010) Lysosomal function in macromolecular homeostasis and bioenergetics in Parkinson's disease. *Mol Neurodegener* 5: 14.
26. Sperelakis N (2001) *Cell physiology sourcebook Texte imprimé a molecular approach*. San Diego San Francisco New York [etc.]: Academic Press. XXV-1235 p.
27. Jung T, Bader N, Grune T (2007) Lipofuscin: formation, distribution, and metabolic consequences. *Ann N Y Acad Sci* 1119: 97-111.
28. Hohn A, Jung T, Grimm S, Catalgol B, Weber D, et al. (2011) Lipofuscin inhibits the proteasome by binding to surface motifs. *Free Radic Biol Med* 50: 585-591.
29. Seehafer SS, Pearce DA (2006) You say lipofuscin, we say ceroid: defining autofluorescent storage material. *Neurobiol Aging* 27: 576-588.
30. Chang TY, Reid PC, Sugii S, Ohgami N, Cruz JC, et al. (2005) Niemann-Pick type C disease and intracellular cholesterol trafficking. *J Biol Chem* 280: 20917-20920.
31. Vanier MT (2010) Niemann-Pick disease type C. *Orphanet J Rare Dis* 5: 16.
32. Fehrenbacher N, Gyrd-Hansen M, Poulsen B, Felbor U, Kallunki T, et al. (2004) Sensitization to the lysosomal cell death pathway upon immortalization and transformation. *Cancer Res* 64: 5301-5310.
33. Guicciardi ME, Leist M, Gores GJ (2004) Lysosomes in cell death. *Oncogene* 23: 2881-2890.
34. Turk B, Turk V (2009) Lysosomes as "suicide bags" in cell death: myth or reality? *J Biol Chem* 284: 21783-21787.
35. Kagedal K, Zhao M, Svensson I, Brunk UT (2001) Sphingosine-induced apoptosis is dependent on lysosomal proteases. *Biochem J* 359: 335-343.
36. Zhao M, Brunk UT, Eaton JW (2001) Delayed oxidant-induced cell death involves activation of phospholipase A2. *FEBS Lett* 509: 399-404.
37. Gyrd-Hansen M, Farkas T, Fehrenbacher N, Bastholm L, Hoyer-Hansen M, et al. (2006) Apoptosome-independent activation of the lysosomal cell death pathway by caspase-9. *Mol Cell Biol* 26: 7880-7891.
38. Wattiaux R, Wattiaux-de Coninck S, Thirion J, Gasingirwa MC, Jadot M (2007) Lysosomes and Fas-mediated liver cell death. *Biochem J* 403: 89-95.
39. Reddy A, Caler EV, Andrews NW (2001) Plasma membrane repair is mediated by Ca(2+)-regulated exocytosis of lysosomes. *Cell* 106: 157-169.
40. Jaiswal JK, Chakrabarti S, Andrews NW, Simon SM (2004) Synaptotagmin VII restricts fusion pore expansion during lysosomal exocytosis. *PLoS Biol* 2: E233.
41. Vitner EB, Platt FM, Futerman AH (2010) Common and uncommon pathogenic cascades in lysosomal storage diseases. *J Biol Chem* 285: 20423-20427.
42. Futerman AH, van Meer G (2004) The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 554-565.
43. Jennings JJ, Jr., Zhu JH, Rbaibi Y, Luo X, Chu CT, et al. (2006) Mitochondrial aberrations in mucopolidosis Type IV. *J Biol Chem* 281: 39041-39050.
44. Alfadhel M, Sirrs S (2011) Enzyme replacement therapy for Fabry disease: some answers but more questions. *Ther Clin Risk Manag* 7: 69-82.

45. Fuller M, Meikle PJ, Hopwood JJ (2006) Epidemiology of lysosomal storage diseases: an overview.
46. Augestad LB, Flanders WD (2006) Occurrence of and mortality from childhood neuronal ceroid lipofuscinoses in Norway. *J Child Neurol* 21: 917-922.
47. Getty AL, Pearce DA (2011) Interactions of the proteins of neuronal ceroid lipofuscinosis: clues to function. *Cell Mol Life Sci* 68: 453-474.
48. Kruer M KA (2011) Lysosomal Storage Disease. Medscape.
49. Salek RM, Pears MR, Cooper JD, Mitchison HM, Pearce DA, et al. (2011) A metabolomic comparison of mouse models of the Neuronal Ceroid Lipofuscinoses. *J Biomol NMR* 49: 175-184.
50. Steinfeld R, Steinke HB, Isbrandt D, Kohlschütter A, Gartner J (2004) Mutations in classical late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis disrupt transport of tripeptidyl-peptidase I to lysosomes. *Hum Mol Genet* 13: 2483-2491.
51. Wang YL, Zeng ZY, Song XW, Hao ZF, Shi YW, et al. (2011) A novel CLN2/TPP1 mutation in a Chinese patient with late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Neurogenetics* 12: 93-95.
52. Jalanko A, Braulke T (2009) Neuronal ceroid lipofuscinoses. *Biochim Biophys Acta* 1793: 697-709.
53. Jolly RD, Dalefield RR, Palmer DN (1993) Ceroid, lipofuscin and the ceroid-lipofuscinoses (Batten disease). *J Inher Metab Dis* 16: 280-283.
54. Beutler E (2004) Enzyme replacement in Gaucher disease. *PLoS Med* 1: e21.
55. Worgall S, Sondhi D, Hackett NR, Kosofsky B, Kekatpure MV, et al. (2008) Treatment of late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis by CNS administration of a serotype 2 adeno-associated virus expressing CLN2 cDNA. *Hum Gene Ther* 19: 463-474.
56. Giacomello M, Drago I, Pizzo P, Pozzan T (2007) Mitochondrial Ca²⁺ as a key regulator of cell life and death. *Cell Death Differ* 14: 1267-1274.
57. Ryu SY, Beutner G, Dirksen RT, Kinnally KW, Sheu SS (2010) Mitochondrial ryanodine receptors and other mitochondrial Ca²⁺ permeable channels. *FEBS Lett* 584: 1948-1955.
58. Ledesma MD, Prinetti A, Sonnino S, Schuchman EH (2011) Brain pathology in Niemann Pick disease type A: insights from the acid sphingomyelinase knockout mice. *J Neurochem* 116: 779-788.
59. Jeyakumar M, Thomas R, Elliot-Smith E, Smith DA, van der Spoel AC, et al. (2003) Central nervous system inflammation is a hallmark of pathogenesis in mouse models of GM1 and GM2 gangliosidosis. *Brain* 126: 974-987.
60. Settembre C, Fraldi A, Jahreiss L, Spanpanato C, Venturi C, et al. (2008) A block of autophagy in lysosomal storage disorders. *Hum Mol Genet* 17: 119-129.
61. Fossale E, Wolf P, Espinola JA, Lubicz-Nawrocka T, Teed AM, et al. (2004) Membrane trafficking and mitochondrial abnormalities precede subunit c deposition in a cerebellar cell model of juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis. *BMC Neurosci* 5: 57.
62. Yu W, Gong JS, Ko M, Garver WS, Yanagisawa K, et al. (2005) Altered cholesterol metabolism in Niemann-Pick type C1 mouse brains affects mitochondrial function. *J Biol Chem* 280: 11731-11739.
63. Tessitore A, del PMM, Sano R, Ma Y, Mann L, et al. (2004) GM1-ganglioside-mediated activation of the unfolded protein response causes neuronal death in a neurodegenerative gangliosidosis. *Mol Cell* 15: 753-766.
64. Vitry S, Bruyere J, Hocquemiller M, Bigou S, Ausseil J, et al. (2010) Storage vesicles in neurons are related to Golgi complex alterations in mucopolysaccharidosis IIIB. *Am J Pathol* 177: 2984-2999.

65. Arduino DM, Esteves AR, Cardoso SM (2011) Mitochondrial fusion/fission, transport and autophagy in Parkinson's disease: when mitochondria get nasty. *Parkinsons Dis* 2011: 767230.
66. Frey TG, Renken CW, Perkins GA (2002) Insight into mitochondrial structure and function from electron tomography. *Biochim Biophys Acta* 1555: 196-203.
67. Heins L, Mentzel H, Schmid A, Benz R, Schmitz UK (1994) Biochemical, molecular, and functional characterization of porin isoforms from potato mitochondria. *J Biol Chem* 269: 26402-26410.
68. Zick M, Rabl R, Reichert AS (2009) Cristae formation-linking ultrastructure and function of mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1793: 5-19.
69. Gross J, Bhattacharya D (2011) Endosymbiont or host: who drove mitochondrial and plastid evolution? *Biol Direct* 6: 12.
70. Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V (2008) Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1alpha. *Cardiovasc Res* 79: 208-217.
71. Diaz F, Moraes CT (2008) Mitochondrial biogenesis and turnover. *Cell Calcium* 44: 24-35.
72. Smeitink J, van den Heuvel L, DiMauro S (2001) The genetics and pathology of oxidative phosphorylation. *Nat Rev Genet* 2: 342-352.
73. Michel S, Wanet A, De Pauw A, Rommelaere G, Arnould T, et al. (2011) Crosstalk between mitochondrial (dys)function and mitochondrial abundance. *J Cell Physiol*.
74. Lopez-Lluch G, Irusta PM, Navas P, de Cabo R (2008) Mitochondrial biogenesis and healthy aging. *Exp Gerontol* 43: 813-819.
75. Alvarez V, Corao AI, Alonso-Montes C, Sanchez-Ferrero E, De Mena L, et al. (2008) Mitochondrial transcription factor A (TFAM) gene variation and risk of late-onset Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 13: 275-280.
76. Holt IJ, Lorimer HE, Jacobs HT (2000) Coupled leading- and lagging-strand synthesis of mammalian mitochondrial DNA. *Cell* 100: 515-524.
77. Brown TA, Cecconi C, Tkachuk AN, Bustamante C, Clayton DA (2005) Replication of mitochondrial DNA occurs by strand displacement with alternative light-strand origins, not via a strand-coupled mechanism. *Genes Dev* 19: 2466-2476.
78. van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW (2008) Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 112-124.
79. Schmidt O, Pfanner N, Meisinger C (2010) Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 655-667.
80. Lev S (2010) Non-vesicular lipid transport by lipid-transfer proteins and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 739-750.
81. Otera H, Mihara K (2011) Molecular mechanisms and physiologic functions of mitochondrial dynamics. *J Biochem* 149: 241-251.
82. Karamanlidis G, Bautista-Hernandez V, Fynn-Thompson F, Del Nido P, Tian R (2011) Impaired Mitochondrial Biogenesis Precedes Heart Failure in Right Ventricular Hypertrophy in Congenital Heart Disease. *Circ Heart Fail*.
83. Sheng B, Wang X, Su B, Lee HG, Casadesus G, et al. (2011) Impaired Mitochondrial Biogenesis Contributes to Mitochondrial Dysfunction in Alzheimer's Disease. *J Neurochem*.
84. Pizzo P, Pozzan T (2007) Mitochondria-endoplasmic reticulum choreography: structure and signaling dynamics. *Trends Cell Biol* 17: 511-517.
85. Correia SC, Carvalho C, Cardoso S, Santos RX, Santos MS, et al. (2010) Mitochondrial preconditioning: a potential neuroprotective strategy. *Front Aging Neurosci* 2.
86. Karp (2004) Structure et fonction de la mitochondrie. *Biologies cellulaire et moléculaire*.

87. Hancock JT, Desikan R, Neill SJ (2001) Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. *Biochem Soc Trans* 29: 345-350.
88. Peng TI, Jou MJ (2010) Oxidative stress caused by mitochondrial calcium overload. *Ann N Y Acad Sci* 1201: 183-188.
89. Andersen JK (2004) Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat Med* 10 Suppl: S18-25.
90. Mates JM (2000) Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* 153: 83-104.
91. Rhee S, Woo H., Kil I., Bae S. (2011) Peroxiredoxin as a Peroxidase for as well as a Regulator and Sensor of Local Peroxides. *JBC Papers* in press.
92. Pines A, Perrone L, Bivi N, Romanello M, Damante G, et al. (2005) Activation of APE1/Ref-1 is dependent on reactive oxygen species generated after purinergic receptor stimulation by ATP. *Nucleic Acids Res* 33: 4379-4394.
93. Deganuto M, Pittis MG, Pines A, Dominissini S, Kelley MR, et al. (2007) Altered intracellular redox status in Gaucher disease fibroblasts and impairment of adaptive response against oxidative stress. *J Cell Physiol* 212: 223-235.
94. Yoon DH, Kwon OY, Mang JY, Jung MJ, Kim do Y, et al. (2011) Protective potential of resveratrol against oxidative stress and apoptosis in Batten disease lymphoblast cells. *Biochem Biophys Res Commun* 414: 49-52.
95. Berridge MJ (1998) Neuronal calcium signaling. *Neuron* 21: 13-26.
96. Gunter TE, Buntinas L, Sparagna G, Eliseev R, Gunter K (2000) Mitochondrial calcium transport: mechanisms and functions. *Cell Calcium* 28: 285-296.
97. Chalmers S, Nicholls DG (2003) The relationship between free and total calcium concentrations in the matrix of liver and brain mitochondria. *J Biol Chem* 278: 19062-19070.
98. Graier WF, Frieden M, Malli R (2007) Mitochondria and Ca(2+) signaling: old guests, new functions. *Pflugers Arch* 455: 375-396.
99. Sano R, Annunziata I, Patterson A, Moshiah S, Gomero E, et al. (2009) GM1-ganglioside accumulation at the mitochondria-associated ER membranes links ER stress to Ca(2+)-dependent mitochondrial apoptosis. *Mol Cell* 36: 500-511.
100. Gewies (2003) Introduction to Apoptosis. *ApoReview*.
101. Kim JS, He L, Lemasters JJ (2003) Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 304: 463-470.
102. Gustafsson AB (2011) Bnip3 as a dual regulator of mitochondrial turnover and cell death in the myocardium. *Pediatr Cardiol* 32: 267-274.
103. Zhang L, Li L, Liu H, Borowitz JL, Isom GE (2009) BNIP3 mediates cell death by different pathways following localization to endoplasmic reticulum and mitochondrion. *FASEB J* 23: 3405-3414.
104. Dorn GW, 2nd, Kirshenbaum LA (2008) Cardiac reanimation: targeting cardiomyocyte death by BNIP3 and NIX/BNIP3L. *Oncogene* 27 Suppl 1: S158-167.
105. Chinnadurai G, Vijayalingam S, Gibson SB (2008) BNIP3 subfamily BH3-only proteins: mitochondrial stress sensors in normal and pathological functions. *Oncogene* 27 Suppl 1: S114-127.
106. Mellor HR, Harris AL (2007) The role of the hypoxia-inducible BH3-only proteins BNIP3 and BNIP3L in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 26: 553-566.
107. Aouacheria A, Brunet F, Gouy M (2005) Phylogenomics of life-or-death switches in multicellular animals: Bcl-2, BH3-Only, and BNip families of apoptotic regulators. *Mol Biol Evol* 22: 2395-2416.

108. Kubli DA, Quinsay MN, Huang C, Lee Y, Gustafsson AB (2008) Bnip3 functions as a mitochondrial sensor of oxidative stress during myocardial ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295: H2025-2031.
109. Ray R, Chen G, Vande Velde C, Cizeau J, Park JH, et al. (2000) BNIP3 heterodimerizes with Bcl-2/Bcl-X(L) and induces cell death independent of a Bcl-2 homology 3 (BH3) domain at both mitochondrial and nonmitochondrial sites. *J Biol Chem* 275: 1439-1448.
110. Ghavami S, Eshraghi M, Kadkhoda K, Mutawe MM, Maddika S, et al. (2009) Role of BNIP3 in TNF-induced cell death--TNF upregulates BNIP3 expression. *Biochim Biophys Acta* 1793: 546-560.
111. Sulistijo ES, MacKenzie KR (2006) Sequence dependence of BNIP3 transmembrane domain dimerization implicates side-chain hydrogen bonding and a tandem GxxxG motif in specific helix-helix interactions. *J Mol Biol* 364: 974-990.
112. Zhao Y, Chen G, Zhang W, Xu N, Zhu JY, et al. (2011) Autophagy regulates hypoxia-induced osteoclastogenesis through the HIF-1alpha/BNIP3 signaling pathway. *J Cell Physiol*.
113. Mizutani A, Furukawa T, Adachi Y, Ikehara S, Taketani S (2002) A zinc-finger protein, PLAGL2, induces the expression of a proapoptotic protein Nip3, leading to cellular apoptosis. *J Biol Chem* 277: 15851-15858.
114. Yang YS, Yang MC, Guo Y, Williams OW, Weissler JC (2009) PLAGL2 expression-induced lung epithelium damages at bronchiolar alveolar duct junction in emphysema: bNip3- and SP-C-associated cell death/injury activity. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 297: L455-466.
115. Mammucari C, Milan G, Romanello V, Masiero E, Rudolf R, et al. (2007) FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell Metab* 6: 458-471.
116. Kong DK, Georgescu SP, Cano C, Aronovitz MJ, Iovanna JL, et al. (2010) Deficiency of the transcriptional regulator p8 results in increased autophagy and apoptosis, and causes impaired heart function. *Mol Biol Cell* 21: 1335-1349.
117. Carter ME, Brunet A (2007) FOXO transcription factors. *Curr Biol* 17: R113-114.
118. Renault VM, Thekkat PU, Hoang KL, White JL, Brady CA, et al. (2011) The pro-longevity gene FoxO3 is a direct target of the p53 tumor suppressor. *Oncogene* 30: 3207-3221.
119. Yurkova N, Shaw J, Blackie K, Weidman D, Jayas R, et al. (2008) The cell cycle factor E2F-1 activates Bnip3 and the intrinsic death pathway in ventricular myocytes. *Circ Res* 102: 472-479.
120. Dyson N (1998) The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev* 12: 2245-2262.
121. Tracy K, Dibling BC, Spike BT, Knabb JR, Schumacker P, et al. (2007) BNIP3 is an RB/E2F target gene required for hypoxia-induced autophagy. *Mol Cell Biol* 27: 6229-6242.
122. Thomas RL, Kubli DA, Gustafsson AB (2011) Bnip3-mediated defects in oxidative phosphorylation promote mitophagy. *Autophagy* 7: 775-777.
123. Kubli DA, Ycaza JE, Gustafsson AB (2007) Bnip3 mediates mitochondrial dysfunction and cell death through Bax and Bak. *Biochem J* 405: 407-415.
124. Westphal D, Dewson G, Czabotar PE, Kluck RM (2011) Molecular biology of Bax and Bak activation and action. *Biochim Biophys Acta* 1813: 521-531.
125. Ghiotto F, Fais F, Bruno S (2010) BH3-only proteins: the death-puppeteer's wires. *Cytometry A* 77: 11-21.
126. Lomonosova E, Chinnadurai G (2008) BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview. *Oncogene* 27 Suppl 1: S2-19.

127. Landes T, Emorine LJ, Courilleau D, Rojo M, Belenguer P, et al. (2010) The BH3-only Bnip3 binds to the dynamin Op1 to promote mitochondrial fragmentation and apoptosis by distinct mechanisms. *EMBO Rep* 11: 459-465.
128. Sowter HM, Ratcliffe PJ, Watson P, Greenberg AH, Harris AL (2001) HIF-1-dependent regulation of hypoxic induction of the cell death factors BNIP3 and NIX in human tumors. *Cancer Res* 61: 6669-6673.
129. Koppen M, Langer T (2007) Protein degradation within mitochondria: versatile activities of AAA proteases and other peptidases. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 42: 221-242.
130. Rikka S, Quinsay MN, Thomas RL, Kubli DA, Zhang X, et al. (2011) Bnip3 impairs mitochondrial bioenergetics and stimulates mitochondrial turnover. *Cell Death Differ* 18: 721-731.
131. Lee Y, Lee HY, Hanna RA, Gustafsson AB (2011) Mitochondrial Autophagy by Bnip3 Involves Drp1-Mediated Mitochondrial Fission and Recruitment of Parkin in Cardiac Myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*.
132. Matsuda N, Sato S, Shiba K, Okatsu K, Saisho K, et al. (2010) PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. *J Cell Biol* 189: 211-221.
133. Zhang J, Ney PA (2009) Role of BNIP3 and NIX in cell death, autophagy, and mitophagy. *Cell Death Differ* 16: 939-946.
134. Suen DF, Norris KL, Youle RJ (2008) Mitochondrial dynamics and apoptosis. *Genes Dev* 22: 1577-1590.
135. Benard G, Bellance N, James D, Parrone P, Fernandez H, et al. (2007) Mitochondrial bioenergetics and structural network organization. *J Cell Sci* 120: 838-848.
136. Santel A, Fuller MT (2001) Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *J Cell Sci* 114: 867-874.
137. de Brito OM, Scorrano L (2008) Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature* 456: 605-610.
138. Santel A, Frank S, Gaume B, Herrler M, Youle RJ, et al. (2003) Mitofusin-1 protein is a generally expressed mediator of mitochondrial fusion in mammalian cells. *J Cell Sci* 116: 2763-2774.
139. Koshiba T, Detmer SA, Kaiser JT, Chen H, McCaffery JM, et al. (2004) Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. *Science* 305: 858-862.
140. Chan DC (2006) Mitochondrial fusion and fission in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22: 79-99.
141. Chen H, McCaffery JM, Chan DC (2007) Mitochondrial fusion protects against neurodegeneration in the cerebellum. *Cell* 130: 548-562.
142. Ishihara N, Eura Y, Mihara K (2004) Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions via GTPase activity. *J Cell Sci* 117: 6535-6546.
143. Eura Y, Ishihara N, Oka T, Mihara K (2006) Identification of a novel protein that regulates mitochondrial fusion by modulating mitofusin (Mfn) protein function. *J Cell Sci* 119: 4913-4925.
144. Hajek P, Chomyn A, Attardi G (2007) Identification of a novel mitochondrial complex containing mitofusin 2 and stomatin-like protein 2. *J Biol Chem* 282: 5670-5681.
145. Nakamura N, Kimura Y, Tokuda M, Honda S, Hirose S (2006) MARCH-V is a novel mitofusin 2- and Drp1-binding protein able to change mitochondrial morphology. *EMBO Rep* 7: 1019-1022.
146. Hoppins S, Edlich F, Cleland MM, Banerjee S, McCaffery JM, et al. (2011) The soluble form of Bax regulates mitochondrial fusion via MFN2 homotypic complexes. *Mol Cell* 41: 150-160.

147. Eiberg H, Kjer B, Kjer P, Rosenberg T (1994) Dominant optic atrophy (OPA1) mapped to chromosome 3q region. I. Linkage analysis. *Hum Mol Genet* 3: 977-980.
148. Delettre C, Griffoin JM, Kaplan J, Dollfus H, Lorenz B, et al. (2001) Mutation spectrum and splicing variants in the OPA1 gene. *Hum Genet* 109: 584-591.
149. Olichon A, Elachouri G, Baricault L, Delettre C, Belenguer P, et al. (2007) OPA1 alternate splicing uncouples an evolutionary conserved function in mitochondrial fusion from a vertebrate restricted function in apoptosis. *Cell Death Differ* 14: 682-692.
150. Praefcke GJ, McMahon HT (2004) The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 133-147.
151. James DI, Parone PA, Mattenberger Y, Martinou JC (2003) hFis1, a novel component of the mammalian mitochondrial fission machinery. *J Biol Chem* 278: 36373-36379.
152. Smirnova E, Shurland DL, Ryazantsev SN, van der Blik AM (1998) A human dynamin-related protein controls the distribution of mitochondria. *J Cell Biol* 143: 351-358.
153. Kemper C, Habib SJ, Engl G, Heckmeyer P, Dimmer KS, et al. (2008) Integration of tail-anchored proteins into the mitochondrial outer membrane does not require any known import components. *J Cell Sci* 121: 1990-1998.
154. Koch A, Thiemann M, Grabenbauer M, Yoon Y, McNiven MA, et al. (2003) Dynamin-like protein 1 is involved in peroxisomal fission. *J Biol Chem* 278: 8597-8605.
155. Pitts KR, McNiven MA, Yoon Y (2004) Mitochondria-specific function of the dynamin family protein DLP1 is mediated by its C-terminal domains. *J Biol Chem* 279: 50286-50294.
156. Ramachandran R, Surka M, Chappie JS, Fowler DM, Foss TR, et al. (2007) The dynamin middle domain is critical for tetramerization and higher-order self-assembly. *EMBO J* 26: 559-566.
157. Friedman JR, Lackner LL, West M, DiBenedetto JR, Nunnari J, et al. (2011) ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science* 334: 358-362.
158. Arnoult D, Rismanchi N, Grodet A, Roberts RG, Seeburg DP, et al. (2005) Bax/Bak-dependent release of DDP/TIMM8a promotes Drp1-mediated mitochondrial fission and mitoptosis during programmed cell death. *Curr Biol* 15: 2112-2118.
159. Santel A, Frank S (2008) Shaping mitochondria: The complex posttranslational regulation of the mitochondrial fission protein DRP1. *IUBMB Life* 60: 448-455.
160. Han XJ, Lu YF, Li SA, Kaitsuka T, Sato Y, et al. (2008) CaM kinase I alpha-induced phosphorylation of Drp1 regulates mitochondrial morphology. *J Cell Biol* 182: 573-585.
161. Chang CR, Blackstone C (2007) Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylation of Drp1 regulates its GTPase activity and mitochondrial morphology. *J Biol Chem* 282: 21583-21587.
162. Wang H, Song P, Du L, Tian W, Yue W, et al. (2011) Parkin ubiquitinates Drp1 for proteasome-dependent degradation: implication of dysregulated mitochondrial dynamics in Parkinson disease. *J Biol Chem* 286: 11649-11658.
163. Ryu SW, Choi K, Kim S, Choi C (2011) Endoplasmic reticulum-specific BH3-only protein BNIP1 induces mitochondrial fragmentation in a Bcl-2- and Drp1-dependent manner. *J Cell Physiol*.
164. Reddy PH, Reddy TP, Manczak M, Calkins MJ, Shirendeb U, et al. (2011) Dynamin-related protein 1 and mitochondrial fragmentation in neurodegenerative diseases. *Brain Res Rev* 67: 103-118.
165. Lawson VH, Graham BV, Flanigan KM (2005) Clinical and electrophysiologic features of CMT2A with mutations in the mitofusin 2 gene. *Neurology* 65: 197-204.

166. Yarosh W, Monserrate J, Tong JJ, Tse S, Le PK, et al. (2008) The molecular mechanisms of OPA1-mediated optic atrophy in *Drosophila* model and prospects for antioxidant treatment. *PLoS Genet* 4: e6.
167. Kaplitt MG (2006) Gene therapy of the central nervous system: from bench to inside. ELSEVIER.
168. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
169. Lin L, Lobel P (2001) Production and characterization of recombinant human CLN2 protein for enzyme-replacement therapy in late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Biochem J* 357: 49-55.
170. Sohar I, Lin L, Lobel P (2000) Enzyme-based diagnosis of classical late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis: comparison of tripeptidyl peptidase I and pepstatin-insensitive protease assays. *Clin Chem* 46: 1005-1008.
171. Presley AD, Fuller KM, Arriaga EA (2003) MitoTracker Green labeling of mitochondrial proteins and their subsequent analysis by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 793: 141-150.
172. De Vos KJ, Sheetz MP (2007) Visualization and quantification of mitochondrial dynamics in living animal cells. *Methods Cell Biol* 80: 627-682.
173. Westermeier R, Marouga R (2005) Protein detection methods in proteomics research. *Biosci Rep* 25: 19-32.
174. Invitrogen (2008) Sensitive, easy protein detection, comparison of the latest western blotting products. Invitrogen.
175. Berra E, Benizri E, Ginouves A, Volmat V, Roux D, et al. (2003) HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1 α in normoxia. *EMBO J* 22: 4082-4090.
176. Semenza GL (2004) Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level. *Physiology (Bethesda)* 19: 176-182.
177. Dorak MT (2006) Real-Time PCR. *Advanced Methods*
178. Jayaraman S (2005) Flow cytometric determination of mitochondrial membrane potential changes during apoptosis of T lymphocytic and pancreatic beta cell lines: comparison of tetramethylrhodamineethyl ester (TMRE), chloromethyl-X-rosamine (H2-CMX-Ros) and MitoTracker Red 580 (MTR580). *J Immunol Methods* 306: 68-79.
179. Safiulina D, Kaasik A, Seppet E, Peet N, Zharkovsky A (2004) Method for in situ detection of the mitochondrial function in neurons. *J Neurosci Methods* 137: 87-95.
180. Smith KJ, Hall SM (1994) Central demyelination induced in vivo by the calcium ionophore ionomycin. *Brain* 117 (Pt 6): 1351-1356.
181. Pollard H, Remy JS, Loussouarn G, Demolombe S, Behr JP, et al. (1998) Polyethylenimine but not cationic lipids promotes transgene delivery to the nucleus in mammalian cells. *J Biol Chem* 273: 7507-7511.
182. Toffoli S, Feron O, Raes M, Michiels C (2007) Intermittent hypoxia changes HIF-1 α phosphorylation pattern in endothelial cells: unravelling of a new PKA-dependent regulation of HIF-1 α . *Biochim Biophys Acta* 1773: 1558-1571.
183. Forsbach A, Muller C, Montino C, Kritzer A, Curdt R, et al. (2011) Impact of delivery systems on siRNA immune activation and RNA interference. *Immunol Lett*.
184. Nisoli E, Carruba MO (2006) Nitric oxide and mitochondrial biogenesis. *J Cell Sci* 119: 2855-2862.
185. Lu B (2009) Mitochondrial dynamics and neurodegeneration. *Curr Neurol Neurosci Rep* 9: 212-219.

186. Chung SH, Calafiore M, Plane JM, Pleasure DE, Deng W (2011) Apoptosis inducing factor deficiency causes reduced mitofusion 1 expression and patterned Purkinje cell degeneration. *Neurobiol Dis* 41: 445-457.
187. Liesa M, Palacin M, Zorzano A (2009) Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. *Physiol Rev* 89: 799-845.
188. Park YY, Lee S, Karbowski M, Neutzner A, Youle RJ, et al. (2010) Loss of MARCH5 mitochondrial E3 ubiquitin ligase induces cellular senescence through dynamin-related protein 1 and mitofusin 1. *J Cell Sci* 123: 619-626.
189. X. Wang BS, W. Liu, X. He, Y. Gao R, Castellani, G. Perry, M. Smith, X. Zhu (2011) DLP1-dependent mitochondrial fragmentation mediates 1-methyl-4-phenylpyridinium toxicity in neurons: implications for Parkinson's disease. *Aging Cell*: 807-823.
190. Wieser W, Krumschnabel G (2001) Hierarchies of ATP-consuming processes: direct compared with indirect measurements, and comparative aspects. *Biochem J* 355: 389-395.
191. Geissler A, Krimmer T, Bomer U, Guiard B, Rassow J, et al. (2000) Membrane potential-driven protein import into mitochondria. The sorting sequence of cytochrome b(2) modulates the deltapsi-dependence of translocation of the matrix-targeting sequence. *Mol Biol Cell* 11: 3977-3991.
192. Cereghetti GM, Costa V, Scorrano L (2010) Inhibition of Drp1-dependent mitochondrial fragmentation and apoptosis by a polypeptide antagonist of calcineurin. *Cell Death Differ* 17: 1785-1794.
193. Shachar T, Lo Bianco C, Recchia A, Wiessner C, Raas-Rothschild A, et al. (2011) Lysosomal storage disorders and Parkinson's disease: Gaucher disease and beyond. *Mov Disord* 26: 1593-1604.
194. Takamura A, Higaki K, Kajimaki K, Otsuka S, Ninomiya H, et al. (2008) Enhanced autophagy and mitochondrial aberrations in murine G(M1)-gangliosidosis. *Biochem Biophys Res Commun* 367: 616-622.
195. Scaduto RC, Jr., Grotyohann LW (1999) Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives. *Biophys J* 76: 469-477.
196. Legros F, Lombes A, Frachon P, Rojo M (2002) Mitochondrial fusion in human cells is efficient, requires the inner membrane potential, and is mediated by mitofusins. *Mol Biol Cell* 13: 4343-4354.
197. Oropesa M, de la Mata M, Maraver JG, Cordero MD, Cotan D, et al. (2011) Apoptotic microtubule network organization and maintenance depend on high cellular ATP levels and energized mitochondria. *Apoptosis* 16: 404-424.
198. Yu T, Robotham JL, Yoon Y (2006) Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 2653-2658.
199. Valero RA, Senovilla L, Nunez L, Villalobos C (2008) The role of mitochondrial potential in control of calcium signals involved in cell proliferation. *Cell Calcium* 44: 259-269.
200. Elzi DJ, Bjornsen AJ, MacKenzie T, Wyman TH, Silliman CC (2001) Ionomycin causes activation of p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinases in human neutrophils. *Am J Physiol Cell Physiol* 281: C350-360.
201. Pan S, Ryu SY, Sheu SS (2011) Distinctive characteristics and functions of multiple mitochondrial Ca²⁺ influx mechanisms. *Sci China Life Sci* 54: 763-769.
202. Brini M, Marsault R, Bastianutto C, Alvarez J, Pozzan T, et al. (1995) Transfected aequorin in the measurement of cytosolic Ca²⁺ concentration ([Ca²⁺]_c). A critical evaluation. *J Biol Chem* 270: 9896-9903.

203. Akimzhanov AM, Boehning D (2011) Monitoring dynamic changes in mitochondrial calcium levels during apoptosis using a genetically encoded calcium sensor. *J Vis Exp*.
204. Soberanes S, Urich D, Baker CM, Burgess Z, Chiarella SE, et al. (2009) Mitochondrial complex III-generated oxidants activate ASK1 and JNK to induce alveolar epithelial cell death following exposure to particulate matter air pollution. *J Biol Chem* 284: 2176-2186.
205. Vengellur (2007) The role of HIF1alpha signaling in metal-induced toxicity. Michigan State University.
206. Feng W, Ye F, Xue W, Zhou Z, Kang YJ (2009) Copper regulation of hypoxia-inducible factor-1 activity. *Mol Pharmacol* 75: 174-182.
207. Hanus J, Kalinowska-Herok M, Widlak P (2008) The major apoptotic endonuclease DFF40/CAD is a deoxyribose-specific and double-strand-specific enzyme. *Apoptosis* 13: 377-382.
208. Zhong N, Wisniewski KE, Hartikainen J, Ju W, Moroziewicz DN, et al. (1998) Two common mutations in the CLN2 gene underlie late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Clin Genet* 54: 234-238.
209. Zhong N (2000) Neuronal ceroid lipofuscinoses and possible pathogenic mechanism. *Mol Genet Metab* 71: 195-206.
210. Sansanwal P, Yen B, Gahl WA, Ma Y, Ying L, et al. (2010) Mitochondrial autophagy promotes cellular injury in nephropathic cystinosis. *J Am Soc Nephrol* 21: 272-283.
211. Brantova O. BA, Sladkova J., Poupetova H., Zivny J., Magner M. Krusek J. Vesela K., Zeman J. (2009) Ultrastructural and functional abnormalities of mitochondria in cultivated fibroblasts from α -mannosidosis patients . *Versita* 64/2: 394-401.
212. Wittig I, Schagger H (2009) Native electrophoretic techniques to identify protein-protein interactions. *Proteomics* 9: 5214-5223.
213. Lucke T, Hoppner W, Schmidt E, Illsinger S, Das AM (2004) Fabry disease: reduced activities of respiratory chain enzymes with decreased levels of energy-rich phosphates in fibroblasts. *Mol Genet Metab* 82: 93-97.
214. McKenzie M, Liolitsa D, Akinshina N, Campanella M, Sisodiya S, et al. (2007) Mitochondrial ND5 gene variation associated with encephalomyopathy and mitochondrial ATP consumption. *J Biol Chem* 282: 36845-36852.
215. Brand MD, Nicholls DG (2011) Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem J* 435: 297-312.
216. Yeung SJ, Pan J, Lee MH (2008) Roles of p53, MYC and HIF-1 in regulating glycolysis - the seventh hallmark of cancer. *Cell Mol Life Sci* 65: 3981-3999.
217. Bittner CX, Loaiza A, Ruminot I, Larenas V, Sotelo-Hitschfeld T, et al. (2010) High resolution measurement of the glycolytic rate. *Front Neuroenergetics* 2.
218. Exner N, Treske B, Paquet D, Holmstrom K, Schiesling C, et al. (2007) Loss-of-function of human PINK1 results in mitochondrial pathology and can be rescued by parkin. *J Neurosci* 27: 12413-12418.
219. Iijima T, Tanaka K, Matsubara S, Kawakami H, Mishima T, et al. (2008) Calcium loading capacity and morphological changes in mitochondria in an ischemic preconditioned model. *Neurosci Lett* 448: 268-272.
220. Nunez L, Senovilla L, Sanz-Blasco S, Chamero P, Alonso MT, et al. (2007) Bioluminescence imaging of mitochondrial Ca²⁺ dynamics in soma and neurites of individual adult mouse sympathetic neurons. *J Physiol* 580: 385-395.

221. Ward MW, Huber HJ, Weisova P, Dussmann H, Nicholls DG, et al. (2007) Mitochondrial and plasma membrane potential of cultured cerebellar neurons during glutamate-induced necrosis, apoptosis, and tolerance. *J Neurosci* 27: 8238-8249.
222. Collins S, Meyer T (2010) Cell biology: A sensor for calcium uptake. *Nature* 467: 283.
223. Rizzuto R, Marchi S, Bonora M, Aguiari P, Bononi A, et al. (2009) Ca²⁺ transfer from the ER to mitochondria: when, how and why. *Biochim Biophys Acta* 1787: 1342-1351.
224. Decuypere JP, Monaco G, Missiaen L, De Smedt H, Parys JB, et al. (2011) IP(3) Receptors, Mitochondria, and Ca Signaling: Implications for Aging. *J Aging Res* 2011: 920178.
225. Launay S, Bober R, Lacabartz-Porret C, Bredoux R, Kovacs T, et al. (1997) Modulation of endoplasmic reticulum calcium pump expression during T lymphocyte activation. *J Biol Chem* 272: 10746-10750.
226. Zampese E, Fasolato C, Kipanyula MJ, Bortolozzi M, Pozzan T, et al. (2011) Presenilin 2 modulates endoplasmic reticulum (ER)-mitochondria interactions and Ca²⁺ cross-talk. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 2777-2782.
227. Ballabio A, Gieselmann V (2009) Lysosomal disorders: from storage to cellular damage. *Biochim Biophys Acta* 1793: 684-696.
228. Pelled D, Lloyd-Evans E, Riebeling C, Jeyakumar M, Platt FM, et al. (2003) Inhibition of calcium uptake via the sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in a mouse model of Sandhoff disease and prevention by treatment with N-butyldeoxynojirimycin. *J Biol Chem* 278: 29496-29501.
229. Kim SJ, Zhang Z, Lee YC, Mukherjee AB (2006) Palmitoyl-protein thioesterase-1 deficiency leads to the activation of caspase-9 and contributes to rapid neurodegeneration in INCL. *Hum Mol Genet* 15: 1580-1586.
230. Van Coppenolle F, Vanden Abeele F, Slomianny C, Flourakis M, Hesketh J, et al. (2004) Ribosome-translocon complex mediates calcium leakage from endoplasmic reticulum stores. *J Cell Sci* 117: 4135-4142.
231. Broer S, Palacin M (2011) The role of amino acid transporters in inherited and acquired diseases. *Biochem J* 436: 193-211.
232. Kim KH, Sleat DE, Bernard O, Lobel P (2009) Genetic modulation of apoptotic pathways fails to alter disease course in tripeptidyl-peptidase 1 deficient mice. *Neurosci Lett* 453: 27-30.
233. Vijayalingam S, Pillai SG, Rashmi R, Subramanian T, Sagartz JE, et al. (2010) Overexpression of BH3-Only Protein BNIP3 Leads to Enhanced Tumor Growth. *Genes Cancer* 1: 964-971.
234. Okami J, Simeone DM, Logsdon CD (2004) Silencing of the hypoxia-inducible cell death protein BNIP3 in pancreatic cancer. *Cancer Res* 64: 5338-5346.
235. Zhang S, Zhang Z, Sandhu G, Ma X, Yang X, et al. (2007) Evidence of oxidative stress-induced BNIP3 expression in amyloid beta neurotoxicity. *Brain Res* 1138: 221-230.
236. Regula KM, Ens K, Kirshenbaum LA (2002) Inducible expression of BNIP3 provokes mitochondrial defects and hypoxia-mediated cell death of ventricular myocytes. *Circ Res* 91: 226-231.

Bibliographie des images:

1. Ganley IG, Lam du H, Wang J, Ding X, Chen S, et al. (2009) ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *J Biol Chem* 284: 12297-12305.

2. Vergne I, Roberts E, Elmaoued RA, Tosch V, Delgado MA, et al. (2009) Control of autophagy initiation by phosphoinositide 3-phosphatase Jumpy. *EMBO J* 28: 2244-2258.
3. Meijer AJ, Codogno P (2009) Autophagy: regulation and role in disease. *Crit Rev Clin Lab Sci* 46: 210-240.
4. Diaz F, Moraes CT (2008) Mitochondrial biogenesis and turnover. *Cell Calcium* 44: 24-35.
5. Ghitto F, Fais F, Bruno S (2010) BH3-only proteins: the death-puppeteer's wires. *Cytometry A* 77: 11-21.
6. Mellor HR, Harris AL (2007) The role of the hypoxia-inducible BH3-only proteins BNIP3 and BNIP3L in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 26: 553-566.
7. Gewies (2003) Introduction to Apoptosis. *ApoReview*.
8. Tait SW, Green DR (2010) Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 621-632.
9. Santel A, Frank S, Gaume B, Herrler M, Youle RJ, et al. (2003) Mitofusin-1 protein is a generally expressed mediator of mitochondrial fusion in mammalian cells. *J Cell Sci* 116: 2763-2774.

- Ballabio A., Gieselmann V., 2009 Lysosomal disorders : from storage to cellular damage *Biochim Biophys Acta*. 1793(4):684-96.
- Boya P., Kroemer G., Lysosomal membrane permeabilization in cell death. *Oncogene*. 27(50):6434-51
- Braulke et Bonifacio, 2009 Sorting of lysosomal proteins. *Biochim Biophys Acta*. 1793(4):605-14
- Carter ME, Brunet A, 2007 FOXO transcription factors. *Curr Biol* 17: R113-114
- Chan DC., 2006 Mitochondrial fusion and fission in mammals *Annu Rev Cell Dev Biol*. 22:79-99.
- Chinnadurai G., Vijayalingam S., Gibson SB, 2008, BNIP3 subfamily BH3-only proteins: mitochondrial stress sensors in normal and pathological functions. *Oncogene* 27 Suppl 1:S114-27.
- D'Autréaux B., Toledano MB, 2007 ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(10):813-24.
- Diaz et Moraes, 2008 Mitochondrial Biogenesis and Turnover *Cell Calcium*. 44(1):24-35.
- Dorak 2006, Real-Time PCR. *Advanced Methods*
- Drago I, Pizzo P., Pozzan T, 2011, After half a century mitochondrial calcium in- and efflux machineries reveal themselves. *EMBO J* 30(20):4119-25
- Eskelinen El., Tanaka Y., Saftig P., 2003, At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins *Trends Cell Biol*. 13(3):137-45.
- Futerman, van Meer, 2004 The cell biology of lysosomal storage disorders *Nat Rev Mol Cell Biol*. (7):554-65.
- Gallagher 2006, One-dimensional SDS gel electrophoresis of proteins. *Curr Protoc Immunol*. Dec;Chapter 8:Unit 8.4
- Hancock JT., Desilkan R., Neill SJ. Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. *Biochem Soc Trans* 29(Pt 2):345-50.
- Hock MB. et Kralli A., 2009 Transcriptional control of mitochondrial biogenesis and function *Annu Rev Physiol*. 71:177-203.
- Krohn 2005, The colorimetric detection and quantification of total protein. *Curr Protoc Toxicol*. Mar;Appendix 3:A.3I.1-28
- Luzio JP, Pryor PR, Bright NA, 2007 Lysosomes : fusion and function *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8(8):622-32.

- Mijaljica D., Rosado C., Devenish R., Prescott M., 2011 Biosensors for Monitoring Autophagy InTech. (19) 384-440
- Murphy AN, Fiskum G, Beal MF, 1999 Mitochondria in neurodegeneration: bioenergetics function in cell life and death. *J Cereb Blood Flow Metab.* 19(3):231-45
- Nisoli E., Carruba MO, 2006 Nitric oxide and mitochondrial biogenesis *J Cell Sci.* 15;119(Pt 14):2855-62.
- Saftig P. et Klumperman J., 2009 Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10(9):623-35.
- Seehafer S., Pearce D., 2006 You say lipofuscin, we say ceroid : defining autofluorescent storage material *Neurobiol Aging.* 27(4):576-88.
- Song Z., Chen H, Fiket M, Alexander C, Chan DC, 2007 OPA1 processing controls mitochondrial fusion and is regulated by mRNA splicing, membrane potential, and Yme1L.
- Tait SW., Green DR. 2010, Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11(9):621-32.
- Zhang D., Guterman D., 2007 Mitochondrial reactive oxygen species-mediated signaling in endothelial cells *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292(5):H2023-31